

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA IN  
TERAPIE AVANZATE BIOMEDICHE E CHIRURGICHE  
*XXXI° CICLO*

TESI DI DOTTORATO

STUDIO DI INTERVENTO RANDOMIZZATO PER VALUTARE L'EFFETTO DELLA DIETA  
MEDITERRANEA SUL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI EMATICI  
E SUI FATTORI DI RISCHIO IN PAZIENTI CON PATOLOGIA CORONARICA

**Coordinatore del dottorato e Tutor**

Ch.mo Prof. Giovanni DI MINNO

**Dottorando**

Manuela AMATO

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

# SOMMARIO

RIASSUNTO .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUZIONE .....	5
ATEROSCLEROSI .....	6
Definizione e fattori eziologici.....	6
Fisiopatologia dell'aterosclerosi.....	7
Fattori di rischio per l'aterosclerosi.....	10
Fattori di rischio non modificabili.....	11
Fattori di rischio modificabili.....	13
Ruolo dell'alimentazione nella prevenzione dell'aterosclerosi.....	16
LA DIETA MEDITERRANEA .....	18
Storia .....	18
Composizione .....	19
Score per la valutazione dell'aderenza alla Dieta Mediterranea .....	21
Ruolo protettivo della Dieta Mediterranea.....	24
Ruolo della Dieta Mediterranea nella prevenzione delle Malattie Cardiovascolari .....	25
LIPIDI E MALATTIE CARDIOVASCOLARI .....	27
ACIDI GRASSI .....	28
Acidi grassi saturi e malattia cardiovascolare .....	34
Acidi grassi monoinsaturi e malattia cardiovascolare.....	36
Acidi grassi polinsaturi e malattia cardiovascolare .....	38
Acidi grassi omega-6 e malattia cardiovascolare .....	39
Acidi grassi omega-3 e malattia cardiovascolare .....	41
Acidi grassi <i>trans</i> e malattia cardiovascolare .....	44
SCOPO DELLA TESI .....	46
MATERIALI E METODI.....	47
Lo Studio RISMeD .....	47
Soggetti .....	47
Disegno dello studio.....	47
Intervento Nutrizionale .....	48
Metodi di Valutazione e Monitoraggio Nutrizionale .....	49
Questionario delle frequenze alimentari (FFQ) .....	49
Valutazione dell'aderenza alla Dieta Mediterranea.....	49
Diario Alimentare .....	50
Analisi di laboratorio .....	51
Determinazione degli Acidi Grassi Ematici.....	51

ANALISI STATISTICA.....	53
RISULTATI .....	54
Arruolamento dei pazienti .....	54
Caratteristiche della popolazione .....	55
Associazione tra abitudini alimentari e profilo di acidi grassi ematici al tempo 0.....	55
<i>Compliance</i> all'intervento dietetico.....	56
Modifiche degli acidi grassi ematici dopo 3 mesi di trattamento dietetico.....	57
Correlazione tra aderenza alla dieta mediterranea e acidi grassi ematici, dopo 3 mesi di intervento dietetico .....	58
DISCUSSIONE e CONCLUSIONI .....	61
TABELLE .....	66
Tabella 1 .....	66
Tabella 2 .....	67
Tabella 3a .....	68
Tabella 3b .....	71
Tabella 4 .....	73
Tabella 5 .....	74
Tabella 6 .....	75
Tabella 7 .....	76
Tabella 8 .....	77
Tabella 9 .....	79
BIBLIOGRAFIA.....	80

# RIASSUNTO

**Introduzione:** Studi osservazionali evidenziano un possibile ruolo della dieta mediterranea (DM) nella prevenzione delle patologie cardiovascolari attraverso meccanismi che coinvolgono la riduzione dell'infiammazione; ma anche il profilo in acidi grassi (FA) ematici è stato associato al rischio cardiovascolare e la sua modificazione, indotta dalla dieta, potrebbe essere un mediatore degli effetti positivi della DM sulla prevenzione cardiovascolare.

**Scopo:** Valutare se la DM sia in grado di modificare i fattori di rischio metabolici classici, il marker di infiammazione proteina C-reattiva e il profilo di FA ematici, in pazienti con patologia coronarica in terapia per il controllo dei fattori di rischio.

**Metodi:** Studio di intervento randomizzato a gruppi paralleli, open-label. Interventi: DM intensiva vs. dieta convenzionale per il controllo del rischio cardiovascolare per 3 mesi. Sono stati reclutati 130 pazienti (30-75 anni) con una storia recente di rivascolarizzazione coronarica, randomizzati dopo stabilizzazione clinica, a cui è stato somministrato il questionario delle frequenze alimentari (FFQ) EPIC per valutare le abitudini nutrizionali. All'inizio dello studio e dopo 3 mesi di trattamento sono stati determinati: dati antropometrici, variabili biochimiche di routine, profilo lipidico, proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) e composizione in acidi grassi del sangue. L'aderenza alla DM è stata valutata in tutti i pazienti utilizzando all'inizio sia lo score di Trichopoulos (MDS), ricavato dall'FFQ EPIC, sia lo score derivato dal Mediterranean Diet Adherence Screener (MeDAS), uno strumento di 14 item sviluppato e validato per lo studio spagnolo PREDIMED. Quest'ultimo è stato utilizzato anche dopo 3 mesi di trattamento. A metà studio è stato somministrato un diario alimentare dei 7 giorni da cui è stata calcolata l'aderenza tramite entrambi gli score.

**Risultati:** 120 pazienti (58 DM, 62 controlli) hanno completato lo studio. In tutti i pazienti il cambiamento del punteggio MeDAS dopo 3 mesi di trattamento era correlato negativamente con cambiamenti di hs-CRP ( $R=-0.22$ ,  $p=.01$ ), colesterolo totale ( $R=-0.41$ ,  $p<.0001$ ), colesterolo LDL ( $R=-0.37$ ,  $p<.0001$ ), trigliceridi ( $R=-0.26$ ,  $p=.005$ ), IMC ( $R=-0.34$ ,  $p=.0001$ ) e circonferenza vita ( $R=-0.25$ ,  $p=.01$ ). Dopo 3 mesi entrambe le diete hanno ridotto in modo significativo la concentrazione ematica di AG saturi, anche se la DM ha modificato maggiormente, rispetto alla

dieta di controllo, la concentrazione ematica di omega-3 ( $p=.026$ ), gli omega-3 a lunga catena ( $p=.039$ ). in particolare, i risultati non sono stati modificati dopo l'aggiustamento per perdita di peso. L'acido arachidonico è aumentato maggiormente nel gruppo assegnato alla DM rispetto al gruppo di controllo ( $p=.049$ ) ma questo cambiamento non è stato accompagnato da un aumento della hs-CRP. Le analisi aggiustate per perdita di peso non hanno modificato i risultati. Infine, considerando l'intero campione, la variazione dello score MeDAS è risultata correlata inversamente con 16:0 ( $R= -0.21$ ,  $p=.02$ ) e 22:5 n-6 ( $R= -0.25$   $p=.007$ ), e positivamente con gli n-3 totali ( $R= 0.19$ ,  $p=.03$ ) e 20:5 n-3 ( $R=0.28$ ,  $p=.002$ ).

**Conclusioni:** In sintesi, una maggiore aderenza alla DM è risultata capace di modificare in modo positivo il profilo degli acidi grassi nel sangue di questi pazienti più efficacemente rispetto alla dieta convenzionale per la riduzione del rischio cardiovascolare. La DM, inoltre, è risultata associata alla riduzione dei fattori di rischio metabolico e della proteina C-reattiva anche in pazienti con CHD polimedicati per massimizzare il controllo dei fattori di rischio.

# ABSTRACT

**Introduction:** Observational studies highlight a possible role of the Mediterranean diet (MD) in the prevention of cardiovascular disease through mechanisms involving the reduction of inflammation. The blood fatty acids (FA) profile has also been associated with cardiovascular risk and its modification, induced by diet, could be a mediator of the positive effects of DM. Consequently, a change in dietary habits, induced by the adoption of a MD, could have positive effects on coronary patients in secondary prevention

**Purpose:** To assess whether MD was able to modify classic metabolic risk factors, the marker of inflammation C-reactive protein and the blood FA profile in patients with coronary heart disease (CHD) on top of poly-therapy with drugs known to influence these factors.

**Methods:** Randomized intervention study on Mediterranean Diet, open-label in parallel groups. Intervention: 130 patients (30-75 years) with a recent history of coronary revascularization were randomized 1:1 after clinical stabilization (>60 days) to intensive MD vs. conventional diet (CD) for 3 months. At the enrollment a validated food-frequency questionnaire (FFQ) was administered to all patients and from which was computed the Trichopoulou score (MDS) in order to evaluate the Mediterranean Diet adherence. At baseline and after 3 months of diet, anthropometric data, routine biochemical variables, lipid profile, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), were determined. At baseline and after 3 months of treatment, adherence to MD was assessed in all patients by using the score derived from the Mediterranean Diet Adherence Screener (MeDAS), a 14-element tool developed and validated in the Spanish PREDIMED study. At the middle of the study a 7 days dietary recall was performed and the MD adherence was assessed by using both MDS and MeDAS.

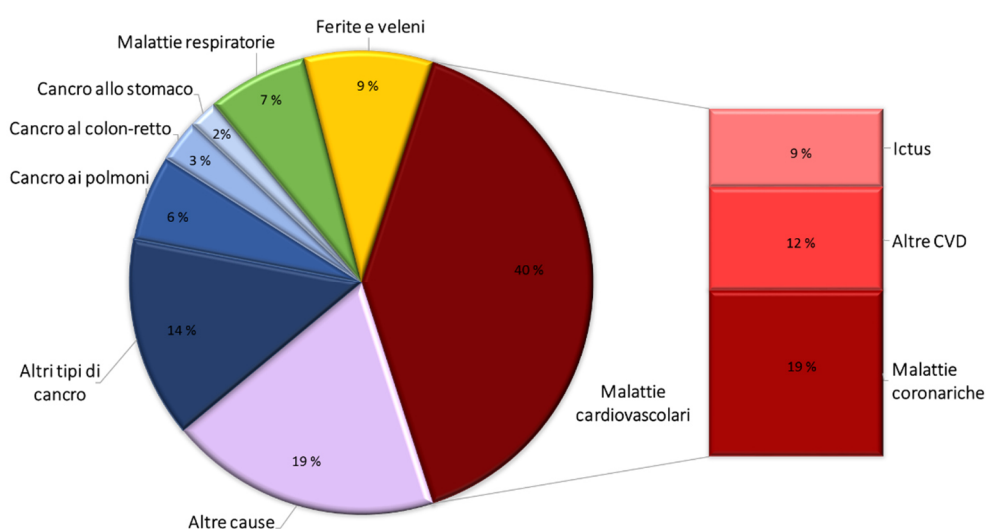
**Results:** 120 patients (58 MD, 62 CD) completed the study. In all patients, the change in MeDAS score after 3 months of treatment was negatively correlated with changes in hs-CRP ( $R=-0.22$ ,  $p=.01$ ), total cholesterol ( $R=-0.41$ ,  $p<.0001$ ), LDL cholesterol ( $R=-0.37$ ,  $p<.0001$ ), triglycerides ( $R=-0.26$ ,  $p=.005$ ), BMI ( $R=-0.34$ ,  $p=.0001$ ) and waist circumference ( $R=-0.25$ ,  $p=.01$ ). After 3 months of treatment many FA varied significantly and both diets significantly reduced the blood concentration of saturated FA ( $p<.0001$ ). Putative favorable changes of blood n-3 ( $p=.026$ ) and of the long chain n-3 ( $p=.039$ ) were significantly larger with MD than with DC. In addition, 20:4 n-6 (arachidonic acid) increased more with MD than with DC ( $p=.049$ ) but this change was not

paralleled by an increase of hs-CRP. Notably, the results were not modified after adjustment for weight loss. The change of MeDAS score correlated with changes of many FA: inversely with 16:0 ( $R = -0.21$ ,  $p = .02$ ), and with 22:5 n-6 ( $R = -0.25$ ,  $p = .007$ ), and positively with total n-3 ( $R = 0.19$ ,  $p = .03$ ) and 20:5 n-3 ( $R = 0.28$ ,  $p = .002$ ).

**Conclusions:** In summary, an increased MD was associated with reduction of metabolic risk factors and hs-CRP even in patients on poly-therapy with drugs known to favorably modify these factors. Moreover, MD improves the blood FA profile, decreasing saturated FA and increasing n-3.

## INTRODUZIONE

Secondo la World Health Organization (WHO), le malattie cardiovascolari (CVD) sono la prima causa di morte nel mondo; nello studio Global Burden of Disease (GDB) [1] del 2013 è stato stimato che le malattie cardiovascolari abbiano causato circa 17,3 milioni di morti, pari al 31,5% della mortalità totale. Secondo dati più recenti (2016), in Europa le CVD sono responsabili di 4 milioni di morti ogni anno, ossia circa il 45% di tutti i decessi; di questi, le malattie coronariche e cerebrovascolari sono le principali, causando rispettivamente 1.8 e 1.0 milioni di morti [2].



Principali cause di morte maschile in Europa. Fonte: WHO Mortality Database [2]

Negli ultimi decenni, è stato documentato un significativo aumento di malattie cardiovascolari e croniche, soprattutto nei paesi a reddito medio-basso. Questo è dovuto, in parte, a cambiamenti importanti nello stile di vita e nella dieta; infatti, diete ad alto impatto calorico, ricche in zuccheri, grassi e sodio, unite ad una riduzione dell'attività fisica e ad un aumento della sedentarietà sono tra le maggiori cause modificabili di malattie croniche. Infatti, insieme con il fumo, queste condizioni sono responsabili per più del 50% della mortalità globale per tutte le cause [3]. Oltre ai fattori di rischio modificabili ci sono una serie di alterazioni fisiologiche e metaboliche associate a mortalità per malattie cardiovascolari, come dislipidemie, obesità, ipertensione, insulino-resistenza e diabete. Sebbene negli ultimi anni, soprattutto nei paesi industrializzati, si sia assistito ad un potenziamento delle misure di prevenzione (primaria e secondaria) e ad un miglioramento dei trattamenti terapeutici che hanno portato ad una riduzione del tasso di mortalità, le malattie cardiovascolari rimangono la principale causa di



decesso e una delle più importanti cause di morbidità, disabilità ed ospedalizzazione nel mondo. Per tale motivo è sicuramente prioritario promuovere stili di vita sani e attivi, riducendo così la sedentarietà, apportare miglioramenti nelle abitudini alimentari per ridurre alcuni dei fattori che concorrono allo sviluppo di tali patologie. La prevenzione cardiovascolare (CV) viene definita come una serie di azioni coordinate intraprese a livello di popolazione e individuale, volte ad eliminare o ridurre al minimo l'impatto delle malattie cardiovascolari e delle relative disabilità. La prevenzione deve essere promossa a livello della popolazione generale, incoraggiando l'adozione di uno stile di vita sano, e a livello individuale, soprattutto nei soggetti con un rischio CV moderato-alto o con patologia accertata, correggendo tutti i fattori di rischio compresi gli stili di vita poco salutari (es. inappropriata alimentazione, inattività fisica, fumo). Gli interventi preventivi sono efficaci, tanto che l'eliminazione dei comportamenti che mettono a rischio la salute, in prevenzione primaria, consentirebbe di prevenire fino all'80% delle CVD [4]. Le principali Linee Guida europee per la prevenzione delle malattie cardiovascolari sono tratte dalla Sesta Task Force Congiunta della Società Europea di Cardiologia e di altre Società sulla Prevenzione delle Malattie Cardiovascolari nella Pratica Clinica e redatte con il contributo straordinario dell'Associazione Europea per la Prevenzione e Riabilitazione Cardiovascolare (EACPR) [4]. Tali Linee Guida riassumono e valutano tutte le evidenze attualmente disponibili in merito alla patologia cardiovascolare con lo scopo di essere di supporto al medico nella scelta della migliore strategia per valutare e stimare il rischio cardiovascolare, per intervenire su stili di vita e terapie, tenendo in considerazione il rapporto rischio-beneficio connesso ad una particolare procedura diagnostica o terapeutica. Un controllo costante del rischio CV individuale è importante in quanto sia il rischio CV che la prevenzione sono processi dinamici e costanti che variano con l'avanzare dell'età del paziente e/o con lo sviluppo di co-morbidità. Ciò implica che, oltre a migliorare lo stile di vita e a ridurre i fattori di rischio noti nei pazienti con CVD e in quelli a maggior rischio di sviluppare CVD, le persone sane di tutte le età dovrebbero essere incoraggiate ad adottare uno stile di vita sano e, da questo punto di vista, i professionisti sanitari nella loro pratica clinica svolgono un ruolo determinante [4].

## **ATEROSCLEROSI**

### **DEFINIZIONE E FATTORI EZIOLOGICI**

L'aterosclerosi è una patologia a carattere infiammatorio a carico della parete arteriosa, caratterizzata da un accumulo progressivo di lipidi e cellule infiammatorie nell'intima delle

arterie [5]. Questa patologia rappresenta la principale causa delle malattie cardiovascolari (CVD) che includono due principali condizioni: la cardiopatia ischemica e la malattia cerebrovascolare, principalmente l'ictus ischemico. L'eziopatogenesi del fenomeno aterosclerotico è complessa e multifattoriale e ancora oggi risulta difficile distinguere i fattori che accelerano e favoriscono la formazione della lesione che, successivamente, potrà portare all'evento patogenetico.

Le prime ipotesi riguardanti la genesi della placca ateromatosa sono state elaborate da Rudolf Virchow, patologo tedesco del XIX secolo, il quale riteneva che una piccola lesione della parete arteriosa provocasse localmente un essudato infiammatorio, causa a sua volta dell'aumento del flusso e dell'accumulo di costituenti del plasma nell'intima dell'arteria [6].

Negli anni '70 queste teorie sono state modificate grazie ai progressi negli studi di biologia molecolare e cellulare della parete arteriosa. Da questi studi nacque "L'ipotesi della reazione alla lesione" per cercare di spiegare la patogenetica dell'aterosclerosi [7]. La lesione endoteliale non veniva più vista, quindi, necessariamente come un deterioramento della parete dell'intima, ma poteva anche semplicemente essere caratterizzata da un'alterazione delle sue funzionalità che ne andava a compromettere le normali proprietà, alterandone la permeabilità. Le varie osservazioni che si sono succedute negli anni seguenti, riguardo alla patogenesi del processo aterosclerotico, sono state soprattutto focalizzate sul ruolo del sovraccarico lipidico e, all'inizio degli anni '90, si condussero studi sul ruolo della flogosi nella patogenesi dell'aterosclerosi.

Ad oggi la teoria più largamente diffusa e accettata dagli studiosi vede l'aterosclerosi come malattia infiammatoria cronica a carico della parete arteriosa. L'infiammazione sembra, infatti, un fattore chiave sia nello sviluppo che nella progressione della placca aterosclerotica [8].

La disfunzione endoteliale porta all'espressione di molecole di adesione sulla membrana cellulare ed alla secrezione di sostanze biologicamente attive (citochine, fattori di crescita, radicali liberi), che sono responsabili dell'infiltrazione dei leucociti, della permeabilità alle lipoproteine plasmatiche e del controllo del tono vasale, quindi alla formazione della placca aterosclerotica [6].

## **FISIOPATOLOGIA DELL'ATEROSCLEROSI**

L'evento alla base della formazione delle lesioni aterosclerotiche è l'accumulo locale di lipidi nello spazio sub-endoteliale della tonaca intima delle arterie che porta alla formazione della placca aterosclerotica, la quale, nei primi stadi, si manifesta sotto forma di lesione precoce, nota come stria lipidica [9]. I lipidi sono trasportati nel plasma sotto forma di

lipoproteine, colesterolo libero e apo-lipoproteine. Le principali lipoproteine plasmatiche sono i chilomicroni, le lipoproteine a bassissima densità (VLDL), le lipoproteine a densità intermedia (IDL o VLDL remnants), le lipoproteine a bassa densità (LDL) e le proteine ad alta densità (HDL). Le lipoproteine contribuiscono diversamente allo sviluppo e alla progressione del processo aterosclerotico: quelle ricche in trigliceridi, chilomicroni e VLDL, non sono considerate aterogene, ma si ritiene che lo siano i derivati dalla loro lipolisi, le VLDL remnants e le LDL, lipoproteine più ricche in colesterolo.

Le lipoproteine che risultano maggiormente implicate nella formazione della placca sono le LDL. Persistendo nel circolo sono sottoposte ad eventi ossidativi diventando LDL mediamente ossidate (MM-LDL) e poi LDL ossidate (oxLDL) [10]. Infatti, l'ossidazione è considerata uno dei fattori predisponenti alla lesione aterosclerotica perché i prodotti ossidati sono in grado di indurre danno endoteliale e chemiotassi. Ad oggi non è ancora stato chiarito se l'ossidazione delle LDL avvenga nel plasma e poi sia la loro forma ossidata ad infiltrarsi sotto l'endotelio oppure se l'ossidazione avvenga nel sito della lesione in seguito all'accumulo di LDL native; probabilmente si verifica l'insieme dei due fenomeni.

Oltre all'infiammazione, come detto precedentemente, anche in conseguenza del danno causato dai prodotti ossidati e dalle alterazioni del flusso sanguigno, le cellule endoteliali si attivano e esprimono delle molecole di adesione producendo mediatori chemiotattici. Le zone in cui solitamente si formano lesioni aterosclerotiche sono spesso caratterizzate da flusso turbolento, come nel caso dei punti di ramificazione.

I primi eventi della formazione delle placche sono quindi dato dall'unione di accumulo di lipidi, ossidazione e attivazione endoteliale, con conseguente attivazione di molecole di adesione. Prodotti dell'ossidazione lipidica e citochine pro-infiammatorie mediano la chemiotassi dei leucociti e l'espressione delle molecole di adesione [5, 11]; le principali sono la molecola di adesione intracellulare 1 (ICAM-1) e la molecola di adesione delle cellule vascolari 1 (VCAM-1), che fanno parte della famiglia delle immunoglobuline.

Dopo avere aderito alla superficie delle cellule endoteliali dell'arteria interagendo con i recettori specifici, i leucociti attraversano lo strato endoteliale e si infiltrano nella tonaca intima. I monociti si differenziano in macrofagi e successivamente fagocitano ingenti quantità di lipidi e si trasformano in cellule schiumose. Infatti, le LDL ossidate si legano in modo preferenziale al recettore scavenger dei macrofagi (un recettore strutturalmente diverso da quello che lega ed

internalizza le LDL native) e vengono assorbite continuamente fino a che il macrofago non assume l'aspetto di cellula schiumosa [12].

Poiché in questo stadio si è verificato solo l'accumulo di lipidi, la lesione è chiamata stria lipidica, presentando una conformazione allungata e di color giallo pallido. Sebbene non dia manifestazioni cliniche, in quanto non riduce il lume del vaso e non ne compromette l'integrità strutturale, può essere rilevata tramite un'ecografia. La stria lipidica precede quindi la formazione vera e propria della placca aterosclerotica; tuttavia non sempre tutte le strie lipidiche progrediscono ad ateroma. Infatti, ciò che distingue la lesione aterosclerotica avanzata dalla stria lipidica è l'accumulo di tessuto fibrotico [13].

La stria lipidica può evolvere in placca fibrosa se permangono le condizioni che ne favoriscono l'evoluzione e se si è formata in zone dell'endotelio particolarmente suscettibili alla formazione di placche, ad esempio le zone in cui il flusso è più turbolento e quindi l'endotelio è sottoposto a maggior stress. Oltre ai monociti/macrofagi, penetrano nella lesione anche cellule linfocitarie, in particolare linfociti T CD8+ (i linfociti CD4+ sono coinvolti in misura minore) che hanno probabilmente un ruolo importante nell'evoluzione della lesione [14].

Le citochine interleuchina-1 (IL-1) e Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (o PDGF, Platelet-Derived Growth Factor) e il Tumor Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), prodotti nelle fasi iniziali del processo aterosclerotico, innescano una risposta infiammatoria che si autoalimenta [15]. In più sono in grado di stimolare la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media alla tonaca intima [16]. La proliferazione delle cellule muscolari lisce rappresenta una fase di transizione critica, in quanto queste sono in grado di generare abbondante matrice extracellulare e formare una lesione fibro-lipidica che va a sostituire il semplice accumulo lipidico delle fasi iniziali. L'accumulo di lipidi viene circondato da formazioni fibrose fino ad esserne quasi interamente sostituito. Inoltre, le citochine prodotte nella lesione, in particolare TNF e IL-1 sono in grado di trasformare l'endotelio da una superficie vascolare, con proprietà anticoagulanti, in una con proprietà aggreganti.

In aggiunta le cellule muscolari attivate sintetizzano collagene, proteoglicani ed elastina conferendo alla lesione ateromatosa un aspetto fibroso. Questo perché, man mano che il processo aterosclerotico procede, la placca fibrosa contiene sempre meno lipidi, localizzati soprattutto al centro della lesione, che derivano dalle lipoproteine rilasciate dalle cellule schiumose che sono andate in apoptosi a causa della carenza di sostanze nutritive e ipossia.

Un evento importante nell'evoluzione strutturale della placca è legato alla neoformazione di plessi di micro-vasi che la vascolarizzano [17]. Questa formazione può essere molto pericolosa in quanto i neo-vasi sono fragili e possono rompersi facilmente producendo emorragie intramurali che fanno aumentare improvvisamente il volume e quindi la capacità trombotica della placca o ne facilitano la fessurazione. Tutti questi processi tendono quindi ad aumentare la fragilità delle placche, favorendone la rottura [18]. Se si verifica il distacco di tutta o parte della placca, si ha la formazione di emboli che, trasportati dal flusso arterioso, vanno a occludere vasi a valle della lesione ateromatosa. Le placche aterosclerotiche possono ingrandirsi fino ad apportare un'occlusione del lume vasale del 90% senza manifestare segni clinicamente evidenti. Le manifestazioni cliniche sono dovute soprattutto a complicanze della lesione per trombosi in seguito a tre eventi principali [18]:

- a) ulcerazione della superficie endoteliale;
- b) rottura della capsula fibrosa;
- c) emorragia dei micro-vasi interni alla lesione;

Nelle placche di stadio avanzato, l'ulcerazione della superficie endoteliale facilita l'adesione piastrinica e la formazione di trombi; in questo modo la lesione può crescere rapidamente, diventando occlusiva. La rottura dell'involucro fibroso della placca invece causa l'esposizione del core lipidico intorno e la formazione di trombi. Gli eventi trombotici possono formarsi anche in seguito ad emorragia inter-placca, a causa della presenza di micro-vasi facilmente lesionabili. La loro rottura scatena la cascata della coagulazione, provocando una trombosi localizzata. Inoltre, i trombi che si sono formati sulla superficie o all'interno della lesione possono causare eventi acuti andando ad occludere completamente il vaso bloccando il flusso sanguigno, con conseguente anossia e necrosi del tessuto circostante (infarto). L'evento può essere causato anche qualora il trombo si stacchi dal sito della lesione e segua il flusso sanguigno, fino a bloccarsi in una ramificazione di un piccolo vaso, impendendone l'afflusso di sangue da quel punto in poi. Anche in quest'ultimo caso viene impedito il corretto apporto di ossigeno, inducendo la morte dei tessuti [19]. Pertanto appare chiaro come sia la dimensione, che, soprattutto, la stabilità strutturale della placca determinino la pericolosità cardiovascolare della patologia.

## **FATTORI DI RISCHIO PER L'ATEROSCLEROSI**

Le cause esatte dell'aterosclerosi non sono ancora state comprese del tutto; tuttavia, alcune condizioni, tratti o abitudini possono aumentare la possibilità di andare in contro ad una

malattia cardiovascolare. I fattori di rischio cardiovascolari sono delle specifiche condizioni che risultano statisticamente correlate ad una malattia cardiovascolare e che si ritiene possano concorrere alla sua patogenesi. Tali fattori non sono agenti causali, ma indicatori di probabilità di comparsa di CVD; ciò significa che la loro assenza non esclude la comparsa della malattia, ma la presenza di uno o più di essi ne aumenta notevolmente il rischio di insorgenza e di sviluppo. Lo studio Framingham Heart Study [20] ha contribuito all'identificazione dei fattori di rischio cardiovascolari ad oggi noti. I risultati dello studio sono stati ampiamente convalidati e la loro importanza globale è stata confermata nello studio INTERHEART [21], uno studio caso-controllo condotto in 52 paesi che ha dimostrato come solo questi fattori di rischio potenzialmente reversibili rappresentino più del 90% del rischio di infarto miocardico acuto (AMI) in tutte le regioni del mondo [22]. I fattori di rischio interagiscono fra loro, incidendo sulla patogenesi delle coronaropatie in maniera fattoriale e non semplicemente additiva, ciò significa che il rischio di malattia o di morte aumenta notevolmente in presenza di due, tre o più fattori. I fattori di rischio cardiovascolare si dividono tradizionalmente in non modificabili e modificabili [23].

## **FATTORI DI RISCHIO NON MODIFICABILI**

### **Età**

L'età rimane un fattore predittivo fondamentale del rischio CVD. Tuttavia, quando l'età è usata contemporaneamente ad altri fattori di rischio per esaminare il rischio futuro di un individuo, è stato ipotizzato che il contributo dell'età nei modelli multivariati possa essere un riflesso dell'intensità e della durata dell'esposizione ad altri fattori di rischio tradizionali [24]. Se questa osservazione fosse vera, l'assenza di questi altri fattori di rischio dovrebbe comportare una riduzione del rischio di CVD associato all'età in sé. Per esaminare questa ipotesi, alcuni risultati preliminari del Framingham Heart Study [20] hanno dimostrato come l'assenza di ciascuno di questi fattori di rischio tradizionali fosse associata ad una riduzione del rischio di CVD anche in età avanzata [25]. In altri risultati della coorte di Framingham, i ricercatori hanno osservato che una diminuzione dei valori di pressione sanguigna e di colesterolo nella mezza età, l'assenza di intolleranza al glucosio, l'astinenza dal fumo, l'istruzione superiore e il sesso femminile portano tutti ad un aumento della sopravvivenza fino a 85 anni di età [25]. Pertanto, il rischio di sviluppare una patologia cardiovascolare dipende generalmente dalla presenza o assenza dei fattori di rischio tradizionali; tuttavia l'aumento dell'età è un fattore di rischio

indipendente. La gravità del rischio di CVD associato all'invecchiamento può, comunque, essere ridotto in parte modificando i fattori di rischio CVD tradizionali coesistenti [26].

### **Sesso**

Le malattie cardiovascolari si sviluppano da 7 a 10 anni più tardi nelle donne che negli uomini, probabilmente grazie ad un effetto protettivo degli estrogeni in età fertile. Ciò porta all'errata percezione che le donne siano "protette" contro le malattie cardiovascolari ed è questo uno dei motivi per cui il rischio di malattia nelle donne è spesso sottovalutato [27]. Tuttavia, in seguito alla menopausa, il rischio sembrerebbe diventare paritario nei due sessi. Studi sperimentali indicano che il genere e la componente ormonale ad esso associata influiscano sull'aumento dei valori della pressione sanguigna e del rischio cardiovascolare. Infatti, il testosterone sembrerebbe avere un'influenza pro-ipertensiva, andando così ad aumentare la pressione sanguigna e di conseguenza il rischio cardiovascolare, mentre gli estrogeni avrebbero influenze antiipertensive [28]. Inoltre, recentemente, sono emerse prove che riconoscono nuovi e potenzialmente indipendenti fattori di rischio cardiovascolari, esclusivi per le donne. In particolare, alcuni disturbi legati alla gravidanza, come l'ipertensione e il diabete gestazionale, così come disturbi endocrini, frequenti nelle donne in età fertile (ad esempio la sindrome dell'ovaio policistico o la menopausa precoce) sono associati ad uno sviluppo precoce di malattia cardiovascolare [29].

### **Familiarità**

I parenti di primo grado biologicamente affini (fratelli, figli e genitori) condividono circa il 50% della loro variazione genetica. Inoltre, spesso, all'interno del medesimo gruppo familiare sono condivisi comportamenti specifici (es. fumo, consumo di alcool, dieta scorretta) o alcuni fattori di rischio (es. ipertensione, ipercolesterolemia, obesità, diabete) che possono peggiorare il grado di rischio dell'evento [23]. È stato osservato come una storia paterna di infarto prematuro aumenti approssimativamente del doppio il rischio di infarto negli uomini e di circa il 70% nelle donne [30, 31]. Il rischio di infarto miocardico aumenta ulteriormente qualora entrambi i genitori abbiano avuto in passato l'evento e soprattutto se uno dei due genitori aveva meno di 50 anni di età [32]. Invece, la storia fraterna di malattie cardiovascolari ha mostrato un aumento del rischio di sviluppare la patologia del 45% (OR, 1.45; 95% CI, 1.10-1.91) [33].

## FATTORI DI RISCHIO MODIFICABILI

I fattori di rischio modificabili sono quelli suscettibili di correzione mediante interventi farmacologici, e/o modifiche dell'alimentazione e dello stile di vita.

### **Dislipidemia**

L'insieme di alterazioni nel profilo lipidico è nota come dislipidemia e favorisce l'insorgenza di aterosclerosi per cui aumenta il rischio di malattia cardiovascolare. La dislipidemia è caratterizzata da trigliceridi elevati, alti livelli di particelle piccole di colesterolo LDL e bassi livelli di colesterolo HDL [34]. I valori ideali sono generalmente determinati sulla base del rischio dell'individuo. L'interazione delle lipoproteine con un elevato numero di enzimi, proteine di trasporto e recettori, costituisce un complesso metabolismo dove l'equilibrio è determinato da fattori intrinseci ed estrinseci, e il suo squilibrio porta alla cascata fisiopatologica dell'aterosclerosi, con le sue ben note conseguenze cliniche. Esistono numerosi dati epidemiologici che dimostrano che livelli elevati di colesterolo nel sangue aumentano il rischio cardiovascolare e che tale rischio dipende dai livelli delle diverse frazioni di colesterolo nel sangue. Diversi studi confermano una relazione diretta tra i livelli di colesterolo LDL e l'incidenza di un primo evento di malattia coronarica in donne e uomini [35]; la stessa relazione diretta è evidenziabile anche per l'incidenza di recidive di eventi cardiovascolari [36]. Inoltre, la riduzione del colesterolo totale nel sangue è stata chiaramente correlata ad una riduzione del rischio di ictus, malattie coronariche e morte cardiovascolare complessiva [37]. Dati recenti hanno dimostrato che il rapporto LDL/HDL e anche il rapporto Colesterolo totale/HDL, sono predittori accurati del rischio cardiovascolare. Infatti, i cambiamenti in questi rapporti si sono dimostrati indicatori migliori di riduzione del rischio di CHD rispetto ai cambiamenti nei livelli assoluti di lipidi o lipoproteine [37]. Esiste, anche, una correlazione inversa tra livelli di HDL e il rischio cardiovascolare. Bassi livelli di colesterolo HDL sono considerati un fattore di rischio indipendente per CVD, in particolare c'è una correlazione tra bassi livelli sierici di HDL e aumento della morbilità e mortalità per malattia coronarica [38]. Anche alti livelli di trigliceridi (TG) e lipoproteine ricche di trigliceridi sono considerati un fattore di rischio cardiovascolare perchè il metabolismo delle lipoproteine è alterato e ciò aumenta il rischio di CVD. I pazienti con TG elevati e lipoproteine a bassa densità sono particolarmente ad alto rischio di CVD. Inoltre, i TG sono spesso associati ad altri fattori di rischio di CVD, come l'obesità, l'insulino-resistenza, il diabete mellito e il basso livello di colesterolo HDL. Il trattamento per ridurre i



livelli di TG elevati negli studi clinici ha dimostrato di ridurre gli eventi CVD, le morti cardiache e la mortalità totale [39].

### **Ipertensione**

In tutto il mondo, l'aumento della pressione sanguigna è stimato in 7,5 milioni di morti, circa il 12,8% del totale di tutti i decessi annuali [40, 41]. L'aumento della pressione sanguigna è uno dei principali fattori di rischio per le malattie coronariche e cerebrovascolari [42]. I livelli di pressione sanguigna hanno dimostrato di essere positivamente e progressivamente correlati al rischio di ictus e cardiopatia coronarica. In alcuni gruppi di età, il rischio di CVD raddoppia per ogni aumento incrementale di 20/10mmHg di pressione sanguigna sistolica/diastolica, a partire da 115/75mmHg. Oltre alle cardiopatie coronariche e cerebrovascolari, la pressione sanguigna elevata e non controllata causa insufficienza cardiaca, insufficienza renale, malattie vascolari periferiche e danni ai vasi sanguigni della retina e alla vista [43].

### **Diabete**

Tra le malattie cardiovascolari e il diabete mellito (DMT) esiste un nesso molto forte. Il rischio cardiovascolare, infatti, aumenta con l'aumento dei valori di glucosio ( $<100\text{mg/dl}$ ) [44]. Un aumentato rischio della mortalità per le malattie cardiovascolari nei pazienti diabetici è stato rilevato sia negli uomini che nelle donne [45]. La mancanza di una diagnosi precoce e di cure per il diabete si traduce spesso in gravi complicazioni, tra cui attacchi cardiaci, ictus, insufficienza renale, fino a neuropatia periferica e complicazioni micro-vascolari periferiche che possono portare a cecità ed amputazioni. Fattori di rischio cardiovascolari come obesità, ipertensione e dislipidemia sono particolarmente frequenti in pazienti con DMT. Inoltre, molti studi riportano come alcuni fattori, tra cui l'aumento dello stress ossidativo, l'aumento della coagulabilità, la disfunzione endoteliale e la neuropatia, spesso presenti in pazienti con DMT, potrebbero contribuire in modo diretto allo sviluppo di CVD [46]. Inoltre, i soggetti diabetici presentano un'aumentata incidenza e severità delle lesioni aterosclerotiche, che si sviluppano più velocemente rispetto a quelle di soggetti non diabetici ed hanno una localizzazione ubiquitaria, interessando sia i grandi che i piccoli vasi [47]. Anche la funzionalità diastolica appare leggermente diminuita nei soggetti diabetici rispetto ai non diabetici [48-50]. Ciò potrebbe essere spiegato dall'aumento della sintesi di trigliceridi che porterebbe ad un aumento del contenuto di trigliceridi nel miocardio [51]. L'aumento dell'accumulo di trigliceridi è associato a lipotossicità ed alterata omeostasi del calcio nel miocardio; entrambe attività che incidono negativamente sulla funzionalità diastolica [52-54]. Molti dei meccanismi che portano

alla riduzione della funzionalità sistolica e diastolica, osservati nei diabetici, potrebbero anche contribuire all'aumento del rischio di scompenso cardiaco; infatti la prevalenza di scompenso è maggiore nei soggetti diabetici (16-31%) rispetto alla popolazione generale (4-6%) [55]. I soggetti diabetici sono esposti ad un rischio di infarto al miocardio almeno raddoppiato rispetto al resto della popolazione [56]. I diabetici tendono ad avere una diminuzione dei fattori anticoagulanti circolanti come la proteina c e l'antitrombina III, e ciò è dovuto soprattutto alla proteinuria presente in soggetti con nefropatia diabetica [57].

Quindi, una più alta presenza di fattori di rischio CV e gli effetti biologici diretti del diabete sul sistema CV pongono i pazienti diabetici ad un aumentato rischio di sviluppo di CVD, e contribuiscono all'aumento della prevalenza di MI, ictus e scompenso cardiaco congestizio (CHF) [46, 58].

### **Fumo**

Il rischio è associato non solo al consumo diretto, ma anche ad un'eccessiva esposizione al fumo passivo. Ogni anno per il fumo muoiono circa 7 milioni di persone nel mondo. Si stima che il fumo causi circa il 10% delle CVD [40]. Ci sono un gran numero di evidenze scientifiche riguardanti l'effetto benefico della cessazione del fumo [45, 46, 48]. Uno studio britannico con follow-up di 50 anni ha dimostrato addirittura che, tra gli ex fumatori, l'età in cui si smette di fumare ha un impatto importante sulle prospettive di sopravvivenza: coloro che smettono di fumare tra i 35 e i 44 anni di età hanno gli stessi tassi di sopravvivenza di coloro che non hanno mai fumato [59].

### **Sedentarietà**

Un'attività fisica insufficiente può essere definita come meno di 5 volte per 30 minuti di attività moderata a settimana, o meno di 3 volte per 20 minuti di attività vigorosa a settimana, o equivalente. Diverse meta-analisi hanno esaminato l'associazione tra attività fisica e malattie cardiovascolari [60]. Berlin & Colditz [61] hanno riportato un rischio relativo di morte per cardiopatia coronarica di 1.9 (95% CI 1.6-2.2) per le persone con occupazioni sedentarie rispetto a quelle con occupazioni attive. Una meta-analisi degli studi sulle donne ha mostrato che l'attività fisica è associata ad un rischio ridotto di malattie cardiovascolari, cardiopatie coronariche e ictus, in modo dose-risposta [62]. L'attività fisica migliora la funzione endoteliale, aumentando la vasodilatazione e la funzione vasomotoria [63]. Inoltre, l'attività fisica contribuisce alla perdita di peso, al controllo glicemico [64], al miglioramento della pressione sanguigna [65], al profilo lipidico [66, 67] e alla sensibilità insulinica [68]. I possibili effetti

benefici dell'attività fisica sul rischio cardiovascolare possono essere mediati, almeno in parte, attraverso questi effetti sui fattori di rischio intermedi [69].

### **Obesità**

L'obesità è un problema che si sta diffondendo non solo nei paesi sviluppati, ma anche in quelli in via di sviluppo. A livello globale, la percentuale di adulti con un indice di massa corporea (IMC, rapporto tra peso e altezza al quadrato) di 25 o superiore è aumentata dal 28,8% (95% UI: 28,4-29,3) nel 1980 al 36,9% (36,3-37,4) nel 2013 per gli uomini e dal 29,8% (29,3-30,2) al 38,0% (37,5-38,5) per le donne [70]. Per mantenere un buono stato di salute, l'obiettivo per gli individui dovrebbe essere quello di mantenere un IMC compreso tra 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>. Vi è, infatti, un aumento del rischio di comorbidità per un IMC di 25,0-29,9 Kg/m<sup>2</sup> ed un rischio da moderato a grave di comorbidità quando vengono superati valori pari a 30 Kg/m<sup>2</sup> [42]. Queste condizioni sono, infatti, fortemente correlati ai principali fattori di rischio cardiovascolare e causano effetti metabolici avversi, come aumento di pressione sanguigna, colesterolo, trigliceridi, intolleranza al glucosio, insulino-resistenza e diabete di tipo 2 [71]. I rischi di cardiopatia coronarica, ictus ischemico e diabete mellito di tipo 2 aumentano costantemente con l'aumento dell'IMC [72].

### **RUOLO DELL'ALIMENTAZIONE NELLA PREVENZIONE DELL'ATEROSCLEROSI**

Come già accennato, l'alimentazione può svolgere un ruolo importante nello sviluppo o nel trattamento delle malattie cardiovascolari. Sane abitudini alimentari possono aiutare a ridurre e controllare i principali fattori di rischio per l'aterosclerosi e le malattie cardiovascolari: la dislipidemia, l'ipertensione, l'obesità e il diabete.

Le stesse linee guida per la prevenzione cardiovascolare stilate nel 2016 dalla Società Europea di Cardiologia (ESC) e da altre 10 Società scientifiche [4] mettono la correzione dello stile alimentare al secondo posto nella lista degli obiettivi della prevenzione cardiovascolare, dopo l'esclusione del tabacco e prima dell'aumento dell'attività fisica, del controllo del peso corporeo, e del mantenimento nella norma dei valori pressori e dei livelli di colesterolo LDL e HDL, dei trigliceridi e dell'emoglobina glicosilata.

Sulla base di solide evidenze scientifiche il documento conferma sostanzialmente le indicazioni già contenute in altre linee guida internazionali [73] e consigliano principalmente quanto segue:

- seguire una dieta equilibrata in termini di calorie totali e corrette proporzioni dei nutrienti, con non più del 25% delle calorie introdotte come grassi, il 15% come proteine e il 60% come

carboidrati. Senza dimenticare l'apporto essenziale delle vitamine, dei sali minerali e dell'acqua;

- ridurre gli acidi grassi saturi a meno del 10% dell'apporto energetico totale, privilegiando il consumo di quelli monoinsaturi (olio di oliva) e polinsaturi (pesce azzurro, salmone, noci, mandorle, ecc.).
- ridurre a meno dell'1% o abolire del tutto gli acidi grassi trans, spesso commercializzati come margarine o presenti nei prodotti da forno industriali, perché minore ne è l'introito e maggiori sono i vantaggi in termini di salute;
- ridurre il sale a non oltre 5 g al giorno. In Europa mediamente il consumo di sale è di 10 g di sale al giorno, che corrispondono a 4 g di sodio, di cui l'80% è già presente negli alimenti. Una quantità eccessiva se si considera che il fabbisogno giornaliero di sodio in condizioni normali è di 1.5 g. La riduzione a 5 g di sale al giorno, che equivalgono in termini pratici ad un cucchiaino da caffè, può contribuire a ridurre del 17% il rischio di malattie cardiovascolari (MCV), soprattutto riducendo l'ipertensione arteriosa;
- favorire il consumo di verdure, ortaggi, frutta, legumi e cereali preferibilmente integrali. I benefici dei cereali integrali sono probabilmente frutto dell'azione sinergica dei diversi costituenti biologicamente attivi, dei quali sono ricchi, in associazione alle fibre. Nella riduzione del rischio di sviluppare coronaropatia, ictus e diabete, correlata all'assunzione di fibra, le principali responsabili sarebbero le fibre solubili (come quelle contenute nell'orzo e nell'avena integrali). In assenza di dati sufficientemente solidi a favore delle fibre di provenienza specifica (legumi, frutta, verdura), gli esperti di EAS e ESC raccomandano un apporto giornaliero di 30-45 g al giorno di fibra totale, sia in prevenzione che nella gestione delle dislipidemie;
- privilegiare il consumo di pesce almeno 1-2 volte a settimana perché è un alimento ricco di minerali, acidi grassi omega-3 ed a basso contenuto di colesterolo. Il consumo di almeno una porzione di pesce alla settimana determina una riduzione del rischio cardiovascolare del 16%. I pesci di allevamento, anche se con caratteristiche organolettiche inferiori, dipendenti anche dai mangimi utilizzati per alimentarli, sembrano mantenere comunque le stesse caratteristiche nutrizionali di quelli pescati in mare aperto. Da preferire il pesce azzurro ricco di grassi omega-3. Bottarga, ostriche, gamberi e cozze sono invece da consumare con attenzione perché contengono considerevoli quantità di colesterolo, che non dovrebbe comunque superare la dose giornaliera di 200 mg;

- scoraggiare il consumo di bevande zuccherate per i loro effetti sull'apporto calorico che può contribuire allo sviluppo del sovrappeso, della sindrome metabolica e del diabete di tipo 2;
- moderare il consumo delle bevande alcoliche, che nella nostra tradizione alimentare si identificano prevalentemente con il vino e la birra. Due bicchieri di vino al giorno per gli uomini, corrispondenti a 20 g di alcol, e un bicchiere per le donne (10 g di alcool), hanno un effetto benefico sulla riduzione delle MCV. Non esistono differenze significative tra vini rossi e bianchi, sapendo comunque che i rossi hanno una maggiore quantità di polifenoli e meno solfiti rispetto a quelli bianchi. Non va inoltre dimenticato l'apporto calorico dell'alcol, che per un bicchiere da 130 ml, di vino di media gradazione, equivale a circa 110-120 calorie, che ovviamente si sommano a quelle introdotte con i pasti.

Quella delineata è una dieta sostanzialmente mediterranea costituita da: un elevato consumo di verdura, frutta, legumi, cereali, pesce, olio di oliva; un moderato consumo di alcol, vino in particolare; un basso consumo di carne rossa, insaccati ed in generale grassi saturi (burro, formaggi, grassi animali, ecc.). Questo modello alimentare è espressione di una corretta alimentazione perché associa gruppi di nutrienti buoni, in proporzioni tali da renderla completa dal punto di vista dei fabbisogni nutrizionali del nostro organismo. Quanto maggiore è l'aderenza ad uno stile alimentare di tipo mediterraneo tanto migliori sono i vantaggi in termini di prevenzione cardiovascolare [74]. È importante comunque sapere che non esistono evidenze scientifiche che dimostrino che sono solo i singoli componenti a fornire protezione nei confronti delle malattie cardiovascolari, bensì l'effetto benefico della dieta è dovuto alla loro associazione e alla loro varietà. Pertanto, la ricerca epidemiologica illustra l'importanza di considerare la dieta totale e la relazione delle sostanze nutritive in un modello dietetico globale.

## LA DIETA MEDITERRANEA

### STORIA

La Dieta Mediterranea (DM) è un modello dietetico formalizzato negli anni 60 da Ancel Benjamin Keys, biologo e fisiologo statunitense, nonché professore associato all'Università di Harvard. Keys visitò il Sud d'Italia per la prima volta quando, arruolato nella quinta armata statunitense durante la Seconda Guerra Mondiale, partecipò allo sbarco delle truppe alleate in Sicilia. Rimase talmente colpito dalle abitudini alimentari in uso nelle regioni del sud Italia che, terminato il conflitto, decise di intraprendere uno studio epidemiologico, con colleghi in diverse zone del mondo, allo scopo di verificare l'esistenza di un possibile legame tra alimentazione e

malattie croniche (malattie cardiovascolari, obesità, tumori). In questo studio, noto come Seven Countries Study [75], sono state valutate le abitudini alimentari di circa 12.000 soggetti residenti in diversi paesi tra cui: Stati Uniti, Finlandia, Paesi Bassi, Italia, Grecia, ex Jugoslavia e Giappone. I primi risultati misero in luce un minor tasso di incidenza di mortalità nei paesi che si affacciavano sul bacino del Mediterraneo, come Grecia e Italia, a differenza degli altri paesi oggetto di studio. Inoltre, tanto più l'alimentazione dei soggetti studiati si discostava da quella mediterranea, maggiore era l'incidenza di malattie cardiovascolari e neoplastiche [76].

La DM, nella formulazione originaria, è fondata su quanto Ancel Keys identificò, durante le sue osservazioni precedenti l'inizio del prestigioso Seven Country Study, come regime alimentare allora presente nel Sud Italia. Esso era caratterizzato dall'assunzione di elevate quantità di alimenti di origine vegetale, legumi, frutta, cereali (pane, pasta), con l'olio di oliva come principale fonte di grassi, e da una scarsa assunzione di carne, soprattutto di carne rossa.


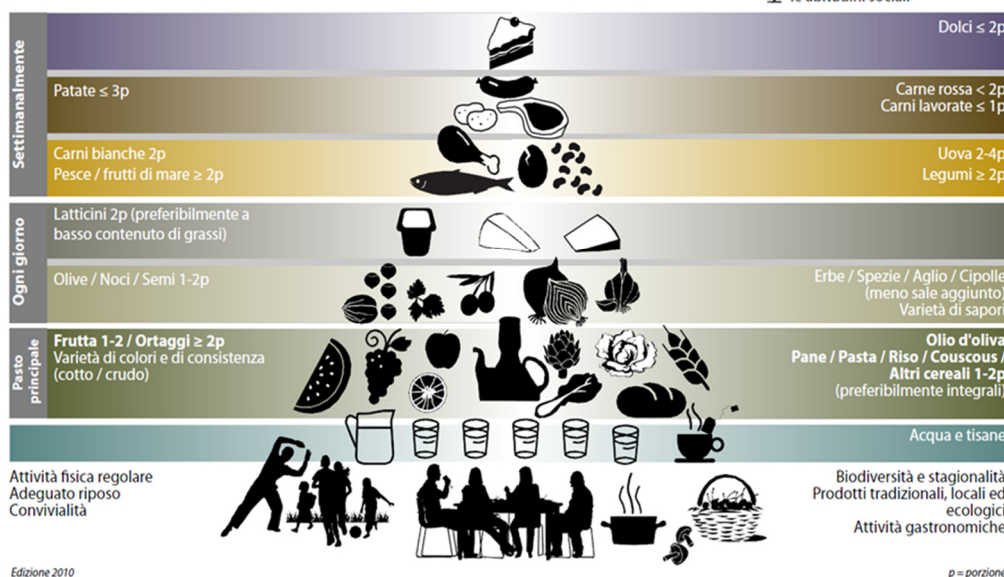
Le abitudini alimentari mediterranee prevedevano, inoltre, un'assunzione moderata-alta di pesce, un'assunzione bassa-moderata di formaggi ed un consumo regolare, ma moderato di alcol, preferibilmente vino rosso, durante i pasti. Con le differenze attribuibili alle caratteristiche culinarie dei diversi paesi, questa può essere una delle definizioni più appropriate della DM [76].

## COMPOSIZIONE

La prima rappresentazione della piramide è stata presentata nel 1993 alla conferenza internazionale sulla DM tenutasi ad Harvard, Boston, nel dipartimento di Salute Pubblica. Da allora, sono state presentate diverse versioni della piramide che sono state adattate alle diverse popolazioni, mantenendo tuttavia la stessa ripartizione delle macro categorie alimentari [77]. Nel corso degli anni la piramide della DM si è evoluta per adattarsi alle nuove esigenze della popolazione. Essa si rivolge alla popolazione adulta sana e può essere adattata a specifici casi come all'età pediatrica, al periodo della gravidanza e dell'allattamento o ad altre condizioni di salute. Nella seguente figura è riportata l'ultima versione della Piramide alimentare proposta nel 2010 dalla Fundación Dieta Mediterránea®[78].

**Piramide Alimentare Mediterranea: uno stile di vita quotidiano**  
 Linee Guida per la popolazione adulta

 Porzioni frugali e secondo le  
 abitudini locali


 Vino con moderazione e secondo  
 le abitudini sociali


La piramide suddivide i gruppi alimentari sulla base della frequenza di consumo, ponendo alla base gli alimenti che dovrebbero fornire la quota maggiore di energia, come alimenti di origine vegetale (cereali, frutta, verdura, legumi, frutta secca) in grado di fornire nutrienti e sostanze protettive che contribuiscono ad uno stato di benessere generale, ed all'apice alimenti che dovrebbero essere consumati con più moderazione, alcuni di essi solo in speciali occasioni. La nuova piramide è il risultato di un consenso internazionale basato sulle ultime evidenze scientifiche sulla salute e sull'alimentazione, pubblicate in svariati articoli scientifici negli ultimi due decenni, che hanno permesso di armonizzare gli strumenti educativi per la promozione della DM nelle diverse culture. L'uso e la promozione di questa piramide sono raccomandati senza alcuna restrizione; inoltre, la piramide è stata tradotta in 10 lingue diverse, in modo tale che possa adattarsi a diversi contesti geografici, socioeconomici e culturali. Questa più moderna rappresentazione fornisce gli elementi chiave per la selezione degli alimenti, sia quantitativamente che qualitativamente, indicando anche le relative porzioni di frequenza di consumo dei principali gruppi alimentari che costituiscono la DM.

La piramide include tutti i gruppi di alimenti, ed è quindi solo una questione di varietà, di tecniche di preparazione dei piatti, di frequenza di consumo e di quantità a far la differenza tra dieta sana e dieta insana nel quotidiano.

La grande varietà di alimenti nella dieta minimizza la possibilità di deficienza di particolari nutrienti. Infatti, un'elevata aderenza alla DM è associata ad un migliore profilo di nutrienti,

mostrando una minore prevalenza di soggetti che mostrano un inadeguato intake di micronutrienti se confrontati con altri pattern dietetici del mondo occidentale.

La piramide indica cosa andrebbe consumato giornalmente, settimanalmente o in modo occasionale per ottenere una dieta sana e bilanciata. Alla base della piramide è indicato il consumo di acqua per garantire una corretta idratazione quotidiana. Ogni giorno sono previsti tre pasti principali che dovrebbero contenere i tre elementi base che sono cereali, vegetali e frutta. Giornalmente sono previsti anche il consumo di olio di oliva come principale grasso da condimento e latticini, preferendo quelli a ridotto contenuto di grassi come latte, yogurt scremati e formaggi freschi. Settimanalmente pesce, carne bianca e uova sono considerati delle buone fonti proteiche, mentre il consumo di carne rossa dovrebbe essere ridotto sia in quantità che in frequenza. È consigliato anche il consumo di legumi in associazione con cereali o patate in modo da raggiungere un corretto profilo proteico. Sono posti al vertice della piramide, invece, dolci, ricchi in zuccheri e grassi, da consumare in modo occasionale. Insieme alle porzioni e alle frequenze di consumo, alla base della piramide sono inclusi elementi culturali e sullo stile di vita, sottolineando l'importanza della convivialità a tavola e di adottare uno stile di vita sano e attivo per aumentare gli effetti positivi della DM. In particolare, spiccano concetti come: moderazione (le porzioni dovrebbero essere adattate alle richieste energetiche e al moderno stile di vita maggiormente sedentario), stagionalità e biodiversità (preferire una dieta varia per garantire un migliore apporto di nutrienti), attività fisica (una regolare attività fisica, almeno 30 minuti al giorno, garantisce un miglioramento dello stato di salute) [79].

## SCORE PER LA VALUTAZIONE DELL'ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA

Come visto, il ruolo protettivo della DM è stato attribuito all'elevato apporto di alcune categorie di alimenti e nutrienti, pertanto, può risultare utile verificare il grado di aderenza alla DM attraverso strumenti di misurazione accurati come gli score dietetici che valutano la frequenza di consumo degli alimenti così come la *compliance* alla porzione raccomandata.

In modo simile agli altri patterns dietetici, la DM può essere valutata usando due approcci:

1. approccio *a priori*: è quello più comunemente usato ed è un approccio basato sulle evidenze scientifiche pre-esistenti; questo significa che gli item per determinare l'aderenza alla DM sono stabiliti in base ai dati di letteratura sulle caratteristiche dei diversi gruppi di alimenti e non tiene in considerazione le abitudini dietetiche delle popolazioni esistenti. Questa metodologia è quella che meglio rappresenta la complessità della dieta ma presume anche che tutti i nutrienti siano di uguale importanza.



2. approccio *a posteriori*: questo approccio è il risultato di un'analisi fattoriale eseguita sui dati relativi alle abitudini alimentari della popolazione in studio per definire i modelli alimentari che si associano ad una determinata condizione.

Pertanto, quando la DM è definita *a priori*, risponde al modello alimentare descritto per le popolazioni dei paesi mediterranei negli anni '60, mentre l'approccio *a posteriori* riflette le abitudini attuali che più si avvicinano al modello mediterraneo.

Una grande varietà di strumenti, indici e scale è stata sviluppata e utilizzata come misura di aderenza alla DM in vari studi epidemiologici, ma non esiste ancora un metodo univoco per valutarla [80].

Il Mediterranean Diet Score (MDS) [81], il MedDiet Score [82], il Mediterranean Diet Adherence Screener derived Score (MeDAS derived score) [83], il Mediterranean Score (MS) [80], il Mediterranean Dietary Quality Index (Med-DQI) [84], il Mediterranean Dietary Pattern adherence index (MDP) [85] e il Mediterranean Style Dietary Pattern Score (MSDPS) [86] sono alcuni degli indici più comunemente usati. Tuttavia, mancano criteri comuni che definiscano la DM, per cui ogni indice si basa sui dati disponibili e sugli obiettivi dello studio [80]. Uno degli indici più utilizzati è il MDS, sviluppato da Trichopoulou et al. nel 1995 [87] e modificato nel 2003 [88]. Il punteggio varia da 0, minima aderenza, a 9, massima aderenza alla DM, e si basa sulla quantità di consumo di alcuni alimenti divisi in gruppi (gruppi tipici dello stile mediterraneo: frutta, verdura, legumi, cereali, pesce; gruppi meno presenti nella DM: carne e latticini). Per determinare il punteggio, come valore limite viene utilizzata la mediana di consumo sesso-specifica della popolazione oggetto di studio; viene assegnato un punto per ciascun gruppo di alimenti positivi, per il rapporto lipidi monoinsaturi/saturi se il consumo è superiore alla mediana, e per il consumo giornaliero di etanolo tra 10 e 50 g per gli uomini e 5 e 25 g per le donne altrimenti il punteggio assegnato è 0; al contrario per ciascuno degli altri due gruppi di alimenti viene assegnato se il consumo è inferiore alla mediana, 0 se il consumo è superiore alla mediana [88]. Nell'MDS e nella maggior parte degli studi, il consumo di olio d'oliva, difficile da stimare negli studi osservazionali, è valutato come parte del rapporto tra grassi monoinsaturi e grassi saturi [88]. L'MDS è stato modificato nel 2005 per poter essere applicato in popolazioni non mediterranee ed il rapporto tra lipidi monoinsaturi/saturi è stato sostituito dal rapporto tra la somma di lipidi monoinsaturi e polinsaturi su saturi [81]. Invece, il MedDiet Score [84], creato da Panagiotakos, valuta il consumo di 11 categorie di gruppi alimentari con un punteggio da 0 a 5 a seconda delle porzioni assunte settimanalmente.

Lo studio PREDIMED [83] è uno studio randomizzato controllato in cui l'out-come primario è stato quello di verificare l'efficacia della DM (in un gruppo supplementata con olio extra vergine di oliva e in un altro supplementata con frutta secca mista) nella riduzione del rischio di malattie cardiovascolari in soggetti ad alto rischio, paragonata ad una dieta ipolipidica (somministrata al gruppo di controllo). Come out-come secondario sono stati, invece, valutati anche gli effetti della dieta sulla mortalità per tutte le cause e l'incidenza di insufficienza cardiaca, diabete, cancro, declino cognitivo ed altri disturbi neurodegenerativi. L'aderenza alla dieta è stata valutata tramite un questionario composto da 14 item. Lo score finale (compreso tra 0 e 14) si ottiene sommando i punteggi attribuiti alle risposte per ciascun item del questionario. Se la risposta soddisfa i criteri predefiniti viene assegnato un punteggio pari a 1, viceversa pari a 0. Uno score finale di 14 punti indica una migliore adesione alla DM.

Anche in Italia sono stati formulati due indici per la valutazione dell'aderenza alla DM, il MAI (Mediterranean Adequacy Index of Italian diets) [87] e l'IMI (Italian Mediterranean Index) [89]. Il MAI è stato ideato da Alberti-Fidanza et al., ed è stato formulato facendo riferimento alle abitudini alimentari rilevate nel 1960 a Nicotera, terza area rurale italiana del Seven Countries Study. Questo score si calcola dividendo la somma della percentuale di energia totale proveniente dai gruppi alimentari tipici del Mediterraneo per la somma della percentuale di energia totale proveniente dai gruppi alimentari non tipici del Mediterraneo. Il MAI del 1960 degli uomini di Nicotera di 40-50 anni risultava pari a 7,5. Analizzando il MAI è stato possibile notare come la dieta dei gruppi di popolazione esaminati in Italia negli ultimi quarant'anni sia cambiata, abbandonando progressivamente le caratteristiche nutrizionali di riferimento di dieta italiana-mediterranea. Anche la dieta dei soggetti di Nicotera, ha subito profonde modificazioni qualitative nel tempo, infatti la mediana del MAI della dieta è scesa a 2,8 nel 1996, rispetto al 7,5 di 36 anni prima [87].

L'IMI [89], sviluppato da Agnoli et. al., invece è un adattamento dell'Indice Mediterraneo Greco [88] al comportamento alimentare italiano. Il punteggio finale si basa sul consumo di 11 gruppi di alimenti: elevate assunzioni di 6 cibi tipici mediterranei (pasta; verdure tipiche mediterranee come pomodori crudi, verdure a foglia, cipolla e aglio, insalata e solanacee; frutta; legumi; olio d'oliva e pesce); basse assunzioni di 4 cibi non mediterranei (bibite, burro, carni rosse e patate); un moderato consumo di alcool. Se il consumo di cibi tipici mediterranei si trova sopra il terzo terzile della distribuzione, viene attribuito 1 punto; altrimenti zero punti. Se il consumo di alimenti non mediterranei si colloca nel primo terzile della distribuzione, viene assegnato 1

punto, altrimenti zero. All'etanolo viene attribuito 1 punto per l'assunzione fino a 12 g/die; zero punti sono attribuiti a consumi superiori o inferiori (astemi) a tale quantità. In totale è possibile ottenere un punteggio che va da 0 a 11.

Come detto, un secondo approccio utilizzato per valutare i modelli alimentari è l'approccio a posteriori, risultato di analisi fattoriali per definire i modelli alimentari che riflettono le abitudini esistenti di una popolazione [90]. Pertanto, quando la DM è definita a priori, risponde al modello alimentare descritto per le popolazioni dei paesi del Mediterraneo negli anni '60, mentre l'approccio a posteriori riflette le abitudini attuali.

## **RUOLO PROTETTIVO DELLA DIETA MEDITERRANEA**

Fin dai tempi di Greci e Romani era diffuso questo modello alimentare, con grande consumo di prodotti agricoli come cereali, olio, vino e ortaggi che sono tra gli alimenti cardine della DM. Tuttavia, i primi dati scientifici che dimostrano le proprietà benefiche di questo stile alimentare sono quelli che derivano proprio dagli studi di Ancel Keys.

Studi biochimici, clinici ed epidemiologici negli ultimi 20 anni hanno apportato solide evidenze riguardo il ruolo benefico della DM, confermando ciò che era stato in origine evidenziato da Keys e collaboratori. Di conseguenza la DM è conosciuta in tutto il mondo come sinonimo di salute e benessere per i suoi effetti protettivi verso il rischio di tumori o malattie metaboliche come le malattie cardiovascolari [91]. La DM è ricca in polifenoli, triptofano, acidi grassi insaturi compresi l'acido oleico (18:1 n-9), l'acido linoleico (LA, 18:2 n-6), l'acido  $\alpha$ -linolenico (ALA, 18:3 n-3), l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3), minerali, vitamine (incluso l'acido folico, vitamina B12, niacina, vitamina B6) e antiossidanti naturali come la vitamina A, E ed altri analoghi. Tutte queste componenti della dieta sono considerate benefiche per la salute umana e sono implicate nell'azione positiva della DM sulla diminuzione dell'obesità addominale, sulla riduzione dei trigliceridi sierici, sul mantenimento o sul miglioramento dei livelli di HDL ematici, sulla riduzione dei valori della pressione sanguigna o sul loro mantenimento nei limiti della norma e sulla riduzione dei livelli di glucosio ematici aumentano la sensibilità all'insulina, riducendone quindi la resistenza [92].

Negli ultimi 5 decenni gli studi sulla DM sono aumentati esponenzialmente; importanti studi epidemiologici prospettici o studi di intervento, come lo Studio PREDIMED [74], hanno contribuito a supportare l'evidenza scientifica riguardo i benefici della DM.

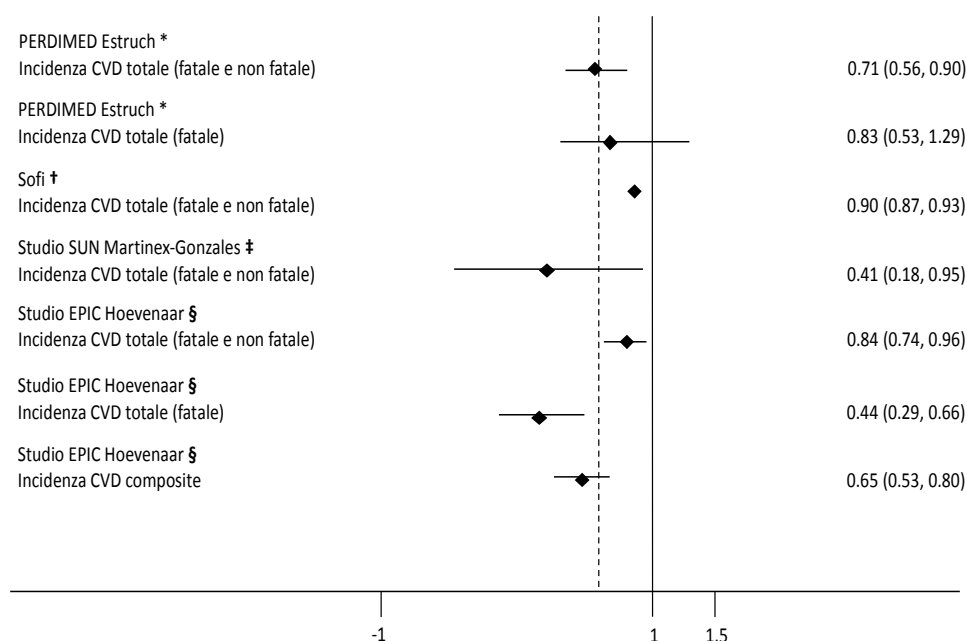
La prima revisione sistematica relativa agli effetti della DM sulla salute, condotta nel 2006 ha mostrato effetti positivi sui livelli di lipoproteine, sulla vasodilatazione endoteliale, sull'insulino-

resistenza, sulla sindrome metabolica, sulla capacità antiossidante, sulla mortalità cardiovascolare, e sull'incidenza di cancro in pazienti obesi o in pazienti con una pregressa storia di infarto al miocardio. In una metanalisi sulle evidenze della relazione tra DM e stato di salute di Sofi et al. [93] pubblicata nel 2008, revisionata nel 2010 [94] e nel 2013 [95], sono stati riportati alcuni aspetti interessanti: un aumento di due punti nello score di aderenza alla DM è associato ad una riduzione del 9% della mortalità totale, ad una riduzione del 10% della mortalità per malattie cardiovascolari, ad una riduzione del 6% nell'incidenza e mortalità per neoplasie e ad una riduzione del 13% nell'incidenza di Parkinson e di Alzheimer nella popolazione generale.

## **RUOLO DELLA DIETA MEDITERRANEA NELLA PREVENZIONE DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI**

Numerosi studi prospettici di coorte hanno indagato una potenziale associazione positiva tra la DM ed incidenza e mortalità di malattie cardiovascolari. Sofi et al. [94] hanno pubblicato una meta-analisi su più studi prospettici di coorte nel 2010, in cui era stato usato uno score a priori per valutare l'aderenza alla DM e l'incidenza di malattie cardiovascolari. Gli outcome comprendevano la mortalità e l'incidenza per CVD. I risultati mostrarono che un più alto livello di aderenza alla DM era collegato significativamente ad una maggiore protezione contro le CVD; in particolare venne mostrato come un aumento di due punti nell'aderenza alla DM fosse associato ad una riduzione del 10% ( $RR = 0.90$ , 95% CI 0.87-0.93) della morte per tutte le CVD. A questa meta analisi ne sono seguite altre sempre per valutare la correlazione DM-CVD. Tra queste troviamo lo studio SUN (Seguimiento University of Navarra) [96], il cui end-point era una combinazione tra incidenza di morte cardiovascolare, sindrome coronarica acuta, ed ictus fatale o non fatale. Tale studio ha evidenziato come una maggiore aderenza alla DM portava ad una significativa riduzione del rischio cardiovascolare ( $HR = 0.41$ , 95% CI 0.18-0.95). I risultati dallo studio EPIC, che non era nato per indagare principalmente le CVD, suggeriscono un ruolo protettivo della DM contro le CVD [97]. Anche Trichopoulou et al. [81] hanno mostrato come una più alta aderenza alla DM sia associata ad una riduzione del 16% dell'incidenza di malattie cardiovascolari ( $HR = 0.84$ , 95% CI 0.75-0.96), una riduzione del 56% dell'incidenza della mortalità per CVD ( $HR = 0.44$ , 95% CI 0.30-0.66) e una riduzione del 35% dell'incidenza di malattie cardiovascolari combinate (mortalità cardiovascolare, infarto al miocardio non fatale e ictus non fatale) ( $HR = 0.65$ , 95% CI 0.53-0.80).

Per quanto riguarda invece trial clinici, i più famosi sono lo studio PREDIMED [83] e lo studio Lyon Diet Heart [98], il primo è condotto su una popolazione in prevenzione primaria ad alto rischio, il secondo in prevenzione secondaria. Lo studio PREDIMED [83] è un largo studio randomizzato controllato volto ad osservare gli effetti della DM nella prevenzione primaria delle malattie cardiovascolari, usando come end-point la morte cardiovascolare, l'infarto al miocardio e l'ictus. In questo caso, l'aderenza alla DM, arricchita con olio extra vergine di oliva o frutta secca, in confronto con una dieta ipolipidica, è risultata favorevole nella riduzione dell'end-point combinato di morte cardiovascolare, l'infarto al miocardio e l'ictus (HR = 0.70, 95% CI 0.54-0.92 per il gruppo con l'olio di oliva e HR = 0.72, 95% CI 0.54-0.96 per il gruppo con la frutta secca). Lo studio Lyon Diet Heart [98], randomizzato e controllato, ha voluto indagare se la DM avesse un impatto positivo sulla ricorrenza dell'infarto al miocardio dopo il primo evento. L'end-point era la morte cardiaca e l'infarto al miocardio non fatale. Anche questo studio ha confermato l'effetto cardioprotettivo della DM (HR = 0.28, 95% CI 0.15-0.53). Pertanto sia studi prospettici di coorte che studi di intervento mostrano come la DM abbia un ruolo protettivo nei confronti dell'incidenza di malattie cardiovascolari [99].



Associazione tra dieta mediterranea e incidenza totale delle malattie cardiovascolari. Il grafico mostra gli Hazard Ratio e gli intervalli di confidenza (IC) di studi prospettici di coorte e studi clinici (prevenzione primaria) per l'incidenza totale delle malattie cardiovascolari. Il centro di ciascun rombo indica il rischio relativo dello studio e le linee orizzontali indicano il 95% di IC (i loro valori sono riportati sul lato destro del grafico).[\*74, ‡90, †94, §97]

L'infiammazione ha un ruolo importante nello sviluppo della patologia cardiovascolare. Il processo infiammatorio è attivato da diversi fattori come l'ipercolesterolemia, l'iperglicemia e l'ipertensione. Gli effetti protettivi della DM nel contrastare lo sviluppo delle CVD è probabilmente in parte mediato dalle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti dei suoi componenti [90]. Gli alimenti che compongono la DM sono poco processati e questo fa sì che la dieta sia più ricca in antiossidanti e da ciò potrebbe dipendere il fatto che sia più protettiva [100]. In più, poiché l'olio di oliva è la principale fonte di grassi ed il consumo di carne ed altri prodotti di origine animale è ridotto, l'apporto di grassi saturi e grassi trans è molto basso [101]. Nordmann et al. hanno condotto una metanalisi di 7 studi clinici randomizzati (RCT) che confronta gli effetti della DM con quelli di una dieta a ridotto tenore lipidico sui fattori di rischio cardiovascolari. Gli autori mostrano come, dopo due anni di follow-up, la DM risulti più efficace nella riduzione dei valori della pressione sistolica e diastolica, del colesterolo totale e nella proteina C reattiva ad alta sensibilità [102].

Anche lo studio PREDIMED ha mostrato come l'aderenza alla DM riduca significativamente i livelli di LDL ossidate, di apolipoproteina B ed aumenti dei livelli di apolipoproteina A-I (il rapporto apoB/apo a-I è un predittore di CHD) [103].

Un'altra metanalisi [101] riguardo agli effetti della DM sulla sindrome metabolica, mostra come l'aderenza alla DM sia in grado di modificare insulino-resistenza, colesterolo HDL, trigliceridi e pressione sanguigna riducendo i fattori di rischio tipici della sindrome metabolica, ma anche delle CVD. In particolare, per quanto riguarda l'insulino-resistenza, sono stati combinati i risultati di 10 trial e l'HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment-insulin resistance, modello omeostatico matematico che considera le concentrazioni sieriche di glucosio e insulina a digiuno) risultava significativamente ridotto nei soggetti con DM rispetto alla dieta di controllo (differenza tra i gruppi -0.45, 95% CI -0.74 a -0.16) [101].

Quindi i risultati degli studi prospettici dimostrano che una maggiore aderenza alla DM è associata ad un miglioramento del profilo lipidico plasmatico, ad una riduzione dell'insulino-resistenza e della pressione sanguigna, e sembrerebbe avere effetti positivi anche sui biomarker di infiammazione e ossidazione [99].

## LIPIDI E MALATTIE CARDIOVASCOLARI

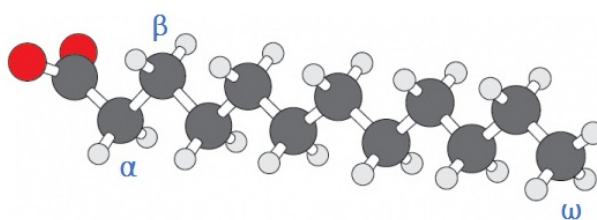
Come visto precedentemente, comune alle linee guida per la gestione delle dislipidemie delle stesse EAS ed ESC è il focus sui tipi e le quantità di grassi da assumere con la dieta. Il ruolo dei grassi alimentari nell'ambito dell'insorgenza e della progressione delle malattie

cardiovascolari negli anni è stato ampiamente studiato in tutta l'Unione europea con particolare attenzione agli effetti dei diversi tipi di acidi grassi sui lipidi e sulle lipoproteine plasmatiche. La determinazione della quantità e della qualità dei grassi alimentari è un elemento importante ai fini della prevenzione e del trattamento delle malattie cardiovascolari. Da tempo, ormai, si ritiene che un consumo elevato di grassi, e in particolare di grassi saturi, contribuisca ad aumentare i livelli di colesterolo plasmatico, uno dei principali fattori di rischio per l'insorgenza di coronaropatie ischemiche. Tale assunto deriva in gran parte dagli studi epidemiologici, che hanno messo in correlazione il consumo dei diversi tipi di grassi con la frequenza di coronaropatie ischemiche.

## ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi sono la componente più importante e comune a tutte le classi lipidiche e, come tali, sono ampiamente presenti negli organismi viventi nei quali svolgono funzioni strutturali, energetiche e metaboliche.

Sono praticamente ubiquitari negli organi e nei tessuti degli esseri viventi anche se con differenze qualitative e quantitative a seconda di specie, funzione, età e tipo di tessuto. Gli acidi grassi sono catene di carbonio con un gruppo metilico ( $-CH_3$ ) ad una estremità della molecola ( $\omega$  o  $n$ ) ed un gruppo carbossile ( $-COOH$ ) all'altra estremità. L'atomo di carbonio accanto al gruppo carbossile è chiamato carbonio  $\alpha$ , ed il successivo sul carbonio  $\beta$ . La lettera  $n$  è spesso usata anche al posto del greco  $\omega$  per indicare la posizione del doppio legame più vicino all'estremità metile.



*Struttura di un Acido Grasso*

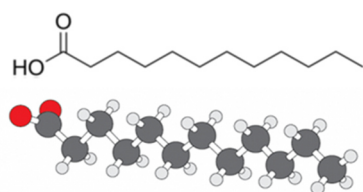
La catena alifatica che li costituisce è tendenzialmente lineare e solo in rari casi si presenta in forma ramificata o ciclica. La lunghezza di questa catena è estremamente importante, in quanto influenza le caratteristiche fisico-chimiche dell'acido grasso. In particolare mano a mano che aumenta il numero di carboni della catena aumenta il punto di fusione perché aumentano le interazioni di Van Der Waals. Gli acidi grassi si possono classificare, a seconda della lunghezza della catena carboniosa, in:

1. Acidi grassi a **corta catena** (SCFA) con un numero di atomi di carbonio compreso tra 2 e 6;
2. Acidi grassi a **media catena** (MCFA) costituiti da 8 a 12 atomi di carbonio;
3. Acidi grassi a **lunga catena** (LCFA) con un numero di atomi di carbonio maggiore o uguale a 14.

Gli acidi grassi possiedono generalmente un numero pari di atomi di carbonio, poiché sono sintetizzati tramite l'aggiunta sequenziale di due atomi di carbonio alla volta partendo dall'Acetil coenzima A (molecola proveniente dal metabolismo di glucidi e amminoacidi), in un processo che prende il nome di *lipogenesi*. Questo processo prevede la carbossilazione dell'AcetilCoA a MalonilCoA, da parte dell'enzima AcetilCoA carbossilasi, quindi l'allungamento della catena grazie ad una serie di enzimi e cofattori organizzata in un unico complesso denominato "sintetasi degli acidi grassi". Quest'ultimo comprende sei enzimi che catalizzano le varie tappe della biosintesi e una proteina trasportatrice di acili (ACP). Il ciclo si ripete fino a che l'acido grasso non raggiunge i 16 atomi di carbonio; a quel punto viene rilasciato sotto forma di acido palmitico.

Gli acidi grassi possono presentare anche uno o più doppi legami nella catena carboniosa, ed in base a ciò essere classificati come:

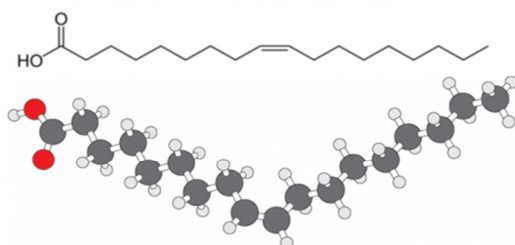
1. Acidi grassi **saturi** (SFA) quando la loro struttura chimica non contiene doppi legami;
2. Acidi grassi **monoinsaturi** (MUFA) quando presentano un solo doppio legame;
3. Acidi grassi **polinsaturi** (PUFA) quando presentano due o più doppi legami.



#### ACIDO GRASSO SATURO

Senza doppi legami

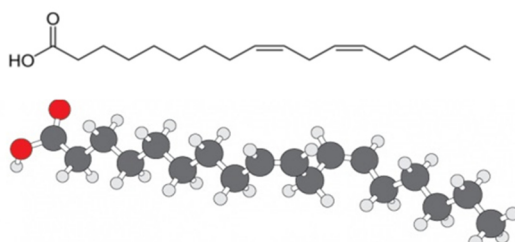
(es. acido laurico, 12:0)



#### ACIDO GRASSO MONOINSATURO

Con un solo doppio legame

(es. acido oleico, 18:1 n-9)



#### ACIDO GRASSO POLIINSATURO

Con due o più doppi legami

(es. acido linoleico, 18:2 n-6)

*Classificazione e struttura degli acidi grassi in base ai doppi legami*



Gli acidi grassi insaturi possono a loro volta essere definiti in base all'isomeria geometrica del doppio legame come *-cis*, se gli atomi di idrogeno legati ai doppi legami sono sullo stesso lato, o *-trans*, se al contrario gli atomi di idrogeno sono su lati opposti del doppio legame. I doppi legami degli acidi grassi insaturi presenti in natura sono molto spesso in configurazione *-cis* e da un punto di vista funzionale questa proprietà ha un ruolo molto importante. La presenza o meno di doppi legami fa variare la temperatura di fusione degli acidi grassi stessi. Gli acidi grassi insaturi infatti presentano un punto di fusione più basso rispetto ai saturi. Le proprietà nutrizionali degli AG dipendono principalmente dalla lunghezza della catena carboniosa, dal numero di doppi legami e, nel caso dei PUFA, dalla posizione delle insaturazioni.

Esistono diversi sistemi di nomenclatura per gli acidi grassi più o meno complessi e dettagliati. La nomenclatura sistematica raccomandata dall'Unione internazionale di chimica pura e applicata (IUPAC-IUB Commission on nomenclature, 1978) designa gli acidi grassi unicamente sulla base del numero di atomi di carbonio e del numero e della posizione dell'insaturazione rispetto al gruppo carbossile. Sono inoltre identificate le posizioni delle insaturazioni e la configurazione dei doppi legami. Quindi, l'acido grasso prende il nome dall'idrocarburo con lo stesso numero e disposizione di atomi di carbonio, sostituendo la *-o* finale del nome dell'idrocarburo con il suffisso *-oico*. Gli atomi di carbonio sono numerati a partire dall'atomo di carbonio carbossilico (carbonio 1). L'atomo di carbonio adiacente al carbonio carbossilico (carbonio 2) è anche noto come alfa, mentre il gruppo metilico terminale è indicato come carbonio omega ( $\omega$ ) che, per ragioni grafiche e di semplificazione, viene spesso sostituito con n. I doppi legami sono etichettati con Z o E, ma sono molto spesso sostituiti dai termini *cis* e *trans*, rispettivamente. Sebbene la nomenclatura IUPAC sia precisa e tecnicamente chiara, i nomi degli acidi grassi sono lunghi e complessi, quindi, per comodità, sono spesso usati negli articoli scientifici i nomi "comuni" o storici. La forma di notazione più comunemente usata è C:D, dove C indica il numero di atomi di carbonio e D il numero di doppi legami nella catena carboniosa.

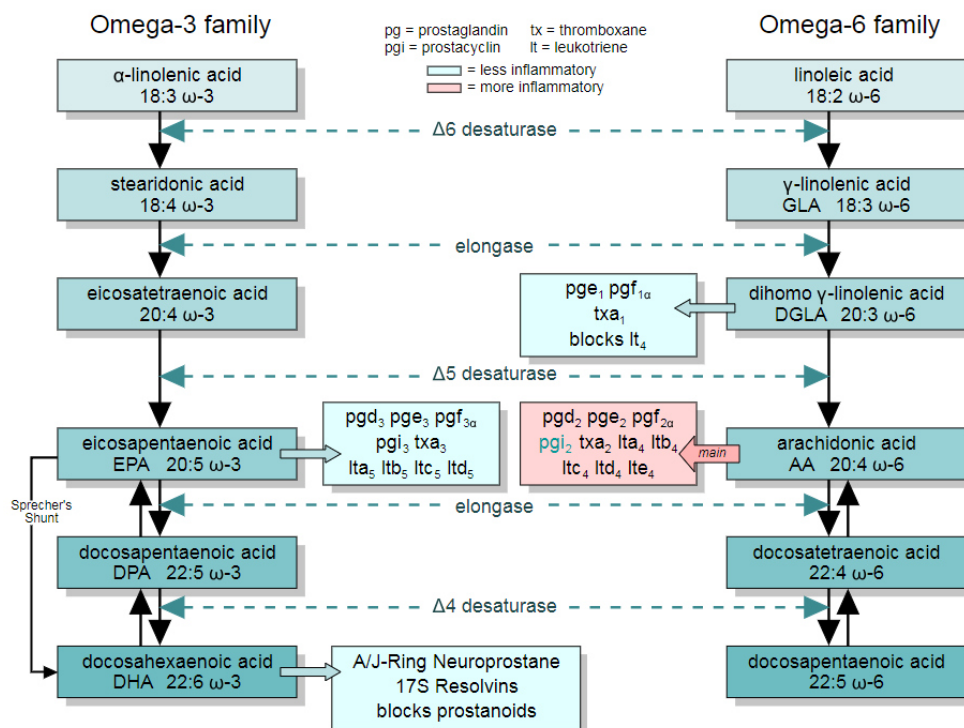
Gli acidi grassi presenti nell'organismo dei mammiferi in parte derivano dalla dieta, in prevalenza trigliceridi introdotti con gli alimenti e, in parte, vengono sintetizzati dall'organismo. La biosintesi degli acidi grassi avviene soprattutto nel fegato, nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo degli organismi superiori. Tuttavia due particolari acidi grassi polinsaturi, gli acidi linoleico (LA) e  $\alpha$ -linolenico (ALA), possono essere sintetizzati soltanto negli organismi vegetali e devono pertanto essere assunti con la dieta; per questo motivo vengono definiti "essenziali". Gli acidi grassi a lunga catena sono necessari per la sintesi di membrane lipidiche,

di ormoni e secondi messaggeri ed inoltre hanno un importante ruolo come riserve di energia. Normalmente vengono immagazzinati come esteri del glicerolo nel tessuto adiposo e rilasciati in circolo al bisogno. Gli acidi grassi assunti con l'alimentazione, sono principalmente trigliceridi, ossia lipidi apolari costituiti da una molecola di glicerolo esterificato con tre molecole di acidi grassi e, per raggiungere il circolo ematico, devono essere digeriti e successivamente assorbiti. Gli acidi grassi dalla dieta sono anche implicati nell'assorbimento di micronutrienti liposolubili in particolar modo delle vitamine liposolubili (vitamine A, D, E e K). Nel plasma gli acidi grassi e, in generale tutti i lipidi, sono trasportati sotto forma di complessi globulari di elevato peso molecolare che ne permettono la stabilità in soluzione, denominati lipoproteine. La struttura delle lipoproteine è caratterizzata da un nucleo centrale, costituito dalle sostanze idrofobe, gli acidi grassi esterificati ed il colesterolo esterificato, circondato da un unico strato esterno di molecole idrofile, quali colesterolo libero, fosfolipidi e proteine denominate apoproteine. Le apoproteine hanno funzione sia di trasporto dei lipidi sia di regolazione del metabolismo delle lipoproteine, con diverse attività tra cui quella di stabilizzazione della molecola lipoproteica, di cofattore di importanti enzimi e di ligandi per recettori specifici. Le diverse classi di lipoproteine ossia chilomicroni, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Intermediate density lipoproteins (IDL) e High Density Lipoprotein (HDL), differiscono per densità, diametro e contenuto in apoproteine, trigliceridi, fosfolipidi, colesterolo e sono classificabili in base a come si separano dopo ultracentrifugazione [104].

Come detto in precedenza, l'organismo è in grado di sintetizzare l'acido palmitico (16:0) a partire da molecole del metabolismo dei glucidi e degli aminoacidi, sintesi endogena degli acidi grassi. Dall'acido palmitico si formano, tramite sistemi enzimatici di allungamento ed insaturazione (elongasi e  $\Delta$ -desaturasi), presenti nei mitocondri e nei microsomi, acidi grassi saturi ed insaturi con un numero di carboni superiore a sedici [105].

Tutti gli organismi viventi posseggono le  $\Delta$ -9 desaturasi in grado di inserire doppi legami tra il nono e il decimo carbonio dell'acido grasso. Ulteriori insaturazioni possono essere inserite negli acidi grassi monoinsaturi ma i mammiferi, a differenza dei vegetali, non posseggono enzimi di desaturazione in grado di inserire doppi legami che distino più di nove atomi di carbonio dall'estremità carbossi-terminale, per cui acidi grassi della serie 9 [106]. Solo gli organismi appartenenti al mondo vegetale hanno conservato la capacità di sintetizzare tutti gli acidi grassi polinsaturi compresi quelli aventi il doppio legame compreso tra il nono atomo di carbonio ed il metile terminale. Per questa ragione, acidi polinsaturi come l'acido linoleico (18:2 n-6, LA) e

l'acido  $\alpha$ -linolenico (18:3 n-3, ALA), sintetizzati nei cloroplasti di foglie, alghe e fitoplancton, sono definiti acidi grassi essenziali (EFA); e, come tali, devono essere introdotti con la dieta. Tuttavia, gli animali sono in grado di desaturare ed allungare ulteriormente questi acidi grassi essenziali dando origine a prodotti a lunga catena con elevato grado d'insaturazione (PUFA) distinti in derivati dell'LA n-6 e dell'ALA n-3 [107]. Tali acidi grassi hanno un metabolismo separato, infatti l'interconversione tra n-3 ed n-6 è impossibile, tranne che nelle alghe e nel fitoplancton, anche se competono per gli stessi sistemi enzimatici, elongasi e  $\Delta$ -desaturasi [108]. Nella figura sottostante è rappresentato il metabolismo degli acidi grassi essenziali.



La  $\Delta$ -6 desaturasi è il primo enzima di conversione per entrambe le serie, omega 6 e omega 3, trasformando LA in acido gamma linolenico (GLA, 18:3 n-6) e l'ALA in acido stearidonico (18:4 n-3) [109]; questi vengono trasformati tramite l'azione di elongasi negli intermedi acido diomo- $\gamma$ -linolenico (20:3 n-6) e acido eicosatetraenoico (20:4 n-3); la  $\Delta$ -5 desaturasi introduce un ulteriore doppio legame e porta rispettivamente alla formazione dell'acido arachidonico (AA, 20:4 n-6) e dell'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3); l'elongasi porta alla sintesi di due acidi grassi con 22 atomi di carbonio aventi 4 o 5 doppi legami [110]. Tra questi, l'acido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3), derivato dall'EPA, costituisce il substrato di sintesi dell'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3) [111].

Il processo di conversione degli acidi grassi essenziali in acidi grassi polinsaturi a lunga catena è regolata da un controllo attivo. La prima reazione del processo, una  $\Delta$ -6 desaturazione, è di tipo competitivo e, in presenza di quantità insufficiente di acidi grassi della serie n-3, porterà prevalentemente alla produzione di acidi grassi della serie n-6, con un significativo aumento del DPA. In carenza di entrambi i substrati, sia di LA sia di ALA invece, si andrà, preferenzialmente, incontro alla sintesi di acidi grassi della serie n-9 con un conseguente accumulo di acido eicosatrienoico (20:3 n-9) [112]. Infine, diversi fattori ambientali, tossici, farmacologici e dietetici [113] possono sia attivare sia inibire le desaturasi limitanti la sintesi degli acidi della serie n-3 e n-6.

Il rilevante ruolo degli acidi grassi deriva dalle funzioni che svolgono nel corpo umano. Principalmente rappresentano una risorsa concentrata di energia, infatti, dalla combustione di un grammo di acido grasso, si libera una quantità di calore pari a 9 kcal, un'energia doppia rispetto a quella fornita dalla degradazione di carboidrati o proteine. Per essere utilizzati con questa funzione gli acidi grassi devono essere ossidati e, il più importante pathway, dal punto di vista sia quantitativo sia qualitativo, risulta essere la  $\beta$ -ossidazione mitocondriale. Gli acidi grassi sono i composti di base per la sintesi di lipidi complessi come trigliceridi, fosfolipidi, sfingolipidi, colesterolo, che costituiscono le membrane cellulari. Le caratteristiche chimico-fisiche degli acidi grassi di membrana sono importanti perché ne determinano la densità, in particolare i PUFA hanno la proprietà di mantenerne la fluidità.

Infine, sono precursori degli eicosanoidi (dal greco eicos = venti) composti, a venti atomi di carbonio, originariamente scoperti nella secrezione prostatica, che includono le prostaglandine, prostaciline, trombossani, leucotrieni, lipossine. Si tratta di autocoidi ossia ormoni che agiscono a livello locale e presentano un'emivita breve.

La biosintesi degli eicosanoidi è limitata alla disponibilità del substrato e dipende principalmente dal rilascio, per azione di enzimi noti come fosfolipasi  $A_2$ , di acido arachidonico, generalmente esterificato in posizione 2 dei fosfolipidi di membrana o di lipidi complessi. Una volta liberato, una parte dell'acido arachidonico è rapidamente metabolizzato tramite la duplice azione, endoperossidasi e idroperossidasi, della ciclossigenasi nei prostanoidi terminali ossia prostaglandine, prostaciline e trombossani [114]. L'acido arachidonico in parte, tramite lipossigenasi o per ossidazione promossa dal citocromo P450, viene convertito rispettivamente a leucotrieni e lipossine o epossidi. Gli eicosanoidi derivano dagli acidi grassi della serie n-3 e n-6. In particolare dall'acido diomo- $\gamma$ -linolenico si ottengono le prostaglandine

della serie 1 (PG<sub>1</sub>) mentre, dall'acido arachidonico le prostaglandine della serie 2 (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>), il trombossano della serie A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), i leucotrieni della serie 4 (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>) ed, infine, dall'EPA il trombossano A<sub>3</sub> (TxA<sub>3</sub>), i leucotrieni della serie 5 (LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub>) e le prostaglandine della serie 3 (PGI<sub>3</sub>, PGD<sub>3</sub>). Questi mediatori hanno un'azione sia diretta che di modulazione dell'attività di altri ormoni con effetti su infiammazione, aggregazione, tono vascolare, a seconda delle differenti classi d'appartenenza. In generale, gli effetti vasodilatanti e antiaggreganti delle prostaglandine della serie 2 e 3 sono considerati equivalenti, invece il TxA<sub>2</sub> ed i leucotrieni della serie 4 hanno un effetto proaggregante, vasocostrittore e proinfiammatorio superiori agli analoghi eicosanoidi derivati dell'EPA. Vi sono scarse evidenze che i prostanoidi della serie 1 e 3 si formino in quantità importanti in condizioni normali, mentre i derivati della serie 2 sono quelli maggiormente rappresentati nei mammiferi [115].

## ACIDI GRASSI SATURI E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Gli acidi grassi saturi vengono classificati, in funzione della lunghezza della catena, in acidi grassi a corta, media o lunga catena. Gli acidi grassi a corta catena sono rappresentati maggiormente da acido butirrico e caproico, sono solubili in acqua, presentano punti di fusione molto bassi e, quindi, in genere, si presentano allo stato oleoso. Normalmente non sono esterificati nei lipidi dell'organismo umano, ad eccezione dei lipidi presenti nel latte materno. A livello intestinale, sono prodotti in quantità significative dalla fermentazione di carboidrati non digeribili, sono utilizzati essenzialmente a scopo energetico e svolgono un ruolo trofico e protettivo sulla mucosa del colon.

In natura esiste una notevole varietà di acidi grassi saturi ma quelli presenti maggiormente come componenti dei lipidi della dieta sono estremamente pochi: il più abbondante è l'acido palmitico (16:0), seguito dall'acido stearico (18:0) miristico (14:0), laurico (12:0), ed infine da acidi grassi a corta catena, in particolare l'acido caproico (6:0) e butirrico (4:0). Le principali fonti di acidi grassi saturi sono di origine animale: carne, strutto, sugna, burro e, in generale nei prodotti caseari ma anche alcuni oli vegetali contengono una quantità elevata di acidi grassi saturi: olio di palma, di cocco e margarine solide.

Studi controllati di intervento alimentare nell'uomo hanno stabilito gli effetti degli SFA alimentari sulle frazioni lipidiche ed hanno dimostrato che i loro effetti variano a seconda dei macronutrienti di confronto [116]. Quando gli SFA vengono sostituiti con i carboidrati, aumenta sia il colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL) che il colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e non si hanno effetti significativi sui markers di rischio per malattia

cardiovascolare, come il rapporto tra colesterolo totale ed HDL o i livelli di ApoB [116]. Al contrario, la sostituzione degli SFA con PUFA e MUFA diminuisce il colesterolo totale, il colesterolo LDL ed anche il rapporto colesterolo totale/HDL, mentre diminuisce solo leggermente il colesterolo HDL [116]. Altri studi di coorte prospettici che hanno valutato l'effetto della sostituzione degli SFA con i PUFA o i carboidrati a basso indice glicemico hanno rilevato significativi benefici per la salute cardiovascolare [117-119]. In una recente analisi del Nurses Health Study (NHS) e dell' Health Professionals Follow-Up Study (HPFS) [119], è stato stimato che la sostituzione del 5% di calorie provenienti dagli SFA con le stesse calorie ottenute da PUFA, MUFA o carboidrati da cereali integrali era significativamente associata ad una riduzione del rischio di CHD rispettivamente del 5%, 15% e 9%. Sebbene gli studi clinici randomizzati (RCT) possano fornire un test diretto per verificare se una riduzione dell'assunzione di SFA riduca il tasso di CHD, la maggior parte degli studi di intervento dietetici presentano limiti e problemi metodologici, quali scarsa aderenza, elevato tasso di abbandono, breve durata e piccole dimensioni del campione. Anche la scelta dei macronutrienti con cui sostituire gli SFA, però, è cruciale per l'interpretazione degli studi randomizzati. Pochissimi RCT hanno testato direttamente l'effetto della sostituzione degli SFA con carboidrati sul rischio di CHD. Nella Women's Health Initiative, l'intervento con basso contenuto di grassi ha ridotto l'assunzione di SFA del 3% di calorie che sono stati sostituiti in gran parte con carboidrati. Tuttavia, rispetto alla dieta di controllo, la dieta a basso contenuto di grassi non ha ridotto significativamente l'incidenza di CHD (RR = 0,93; 95% CI, 0,83-1,05) e di CVD totale (RR = 0,96; 95% CI, 0,89-1,03) durante il follow-up di 8 anni [120]. Questo studio indica che la semplice riduzione dei lipidi totali ed in particolare degli SFA non è efficace nel ridurre il rischio di malattie cardiovascolari. Il rapporto tra acidi grassi saturi provenienti da diverse fonti alimentari e rischio di CHD è stato studiato nel Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis e nella coorte olandese dell'European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) [121, 122]. Entrambi questi gli studi hanno riportato che un più alto consumo di SFA derivati dai latticini sia associato ad un rischio più basso di CHD, mentre per gli SFA provenienti da altre fonti non sono state trovate associazioni. Sulla base di questi risultati, alcuni ricercatori hanno proposto che gli effetti degli SFA possano essere modulati dalle loro fonti alimentari e che gli SFA dei latticini possano avere benefici cardiovascolari. Tuttavia, gli SFA dei latticini sono altamente correlati con altri componenti dei prodotti caseari, come calcio, magnesio o potassio; pertanto, è quasi impossibile scindere gli effetti degli SFA contenuti nei latticini dagli altri componenti in essi

presenti. Un recente studio condotto su tre coorti prospettiche, NHS, NHS II e HPFS, ha mostrato che l'assunzione di grassi derivanti da latticini, rispetto all'assunzione di carboidrati totali, non era associata al rischio di CVD, CHD o ictus. Al contrario, la sostituzione dei grassi provenienti dai latticini con fonti di grassi vegetali e PUFA era correlata ad un rischio di CVD inferiore [123]. Diversi studi hanno tentato di distinguere le associazioni potenzialmente divergenti tra i singoli SFA ed il rischio di CHD. Gli effetti degli SFA sui lipidi ematici variano a seconda della lunghezza della catena di carbonio dei singoli SFA. L'acido stearico (18:0) non ha alcun effetto sul rapporto TC/HDL, mentre gli SFA a catena corta, come gli acidi laurico (12:0), miristico (14:0) e palmitico (16:0), mostrano un maggior effetto di aumento del colesterolo LDL. Un aumento dell'assunzione di acido laurico porta anche ad un sostanziale aumento del colesterolo HDL e ad una significativa diminuzione del rapporto TC/HDL [116]. Sebbene sia stato suggerito che gli SFA a catena più lunga, come l'acido palmitico che è il più abbondante degli SFA in una tipica dieta occidentale, sia associato ad un rischio di CHD maggiore rispetto altri SFA a catena più corta, non è utile distinguere i singoli SFA con diverse lunghezze di catena carboniosa nelle raccomandazioni alimentari, perché ci sono correlazioni molto elevate tra gli stessi SFA, che provengono da fonti alimentari condivise come i latticini e le carni [124, 125]. Gli effetti dell'assunzione di acidi grassi saturi su altri fattori di rischio CV, tra cui l'infiammazione sistemica, la pressione sanguigna e la resistenza all'insulina, non sono stati ben caratterizzati rispetto a quelli sui lipidi ematici.

## ACIDI GRASSI MONOINSATURI E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

I MUFA sono acidi grassi con un solo doppio legame. L'acido grasso monoinsaturo più comune nella dieta umana è l'acido oleico poiché rappresenta circa il 90% dei MUFA totali. L'interesse iniziale per l'effetto dei MUFA sulla malattia cardiovascolare nasce da un'osservazione nel Seven Country Study, secondo cui alcune popolazioni del Mediterraneo avevano una bassa prevalenza di CHD [126]. Una DM tradizionale è elevata in MUFA (dal 16 al 29% dell'apporto energetico totale), soprattutto grazie all'elevato consumo di olio d'oliva. Studi controllati di intervento dietetico hanno dimostrato che la sostituzione dei carboidrati con i MUFA abbassa il colesterolo totale e LDL ed aumenta il colesterolo HDL, diminuendo così il rapporto colesterolo totale/HDL e predicendo un minor rischio di malattia cardiovascolare [116]. L'assunzione di MUFA influisce favorevolmente anche su altri fattori di rischio cardiovascolari, inclusi i fattori correlati alla trombogenesi, alla suscettibilità ossidativa delle LDL in vitro, alla sensibilità all'insulina ed ai fattori infiammatori [127-130]. Anche se

L'assunzione di MUFA, in sostituzione dei carboidrati, ha mostrato effetti favorevoli sul profilo lipidico, l'assunzione di MUFA generalmente non è stata associata al rischio di CHD negli studi di coorte prospettici che specificavano i carboidrati totali come nutriente di confronto [117-119] o quelli senza esplicita indicazione del nutriente di confronto [131, 132]. Una spiegazione di questa discrepanza è la forte correlazione tra MUFA e SFA dovuta alla condivisione di fonti alimentari come i latticini e le carni nella maggior parte delle diete occidentali. In un recente studio, l'assunzione di MUFA, se confrontata con quella di carboidrati totali, era associata ad un rischio significativamente più basso di malattia cardiovascolare e mortalità totale durante un follow-up di 32 anni; l'HR per la sostituzione del 5% di energia da carboidrati con l'energia equivalente derivante dai MUFA era 0,90 (95% CI, 0,83-0,98) per la mortalità da CVD e 0,90 (95% CI, 0,87-0,94) per la mortalità totale [133]. Questi risultati sono stati diversi dalle associazioni nulle o addirittura positive osservate negli studi precedenti, perché nelle coorti le principali fonti alimentari di MUFA nel tempo sono state modificate da alimenti di origine animale, principalmente carne rossa, ad alimenti di origine vegetale, come olio d'oliva e noci [133]. Analogamente a questi risultati, Guasch-Ferré et al. hanno riportato che l'assunzione di MUFA, rispetto ai carboidrati, nello studio PREDIMED era inversamente associata al rischio totale di CVD (HR = 0.63; 95% CI, 0.43-0.94), forse perché la principale fonte alimentare di MUFA in questa popolazione era l'olio d'oliva [134]. Gli studi di coorte prospettici hanno anche dimostrato che l'assunzione di MUFA, in sostituzione degli SFA, era correlata ad un rischio cardiovascolare più basso. Un recente lavoro nel NHS e nell'HPFS ha osservato un rischio di CHD inferiore del 15% (HR = 0.85; 95% CI, 0.74-0.97) sostituendo il 5% di energia proveniente dagli SFA con energia proveniente dai MUFA [119]. In una meta-analisi, il rapporto tra MUFA ed SFA è stato associato ad un rischio significativamente più basso di morte per malattia cardiovascolare (RR = 0.91; 95% CI, 0.83-0.99) [132]. L'olio d'oliva, in quanto abbondante fonte alimentare di MUFA, è stato inoltre correlato ad un minor rischio di CVD in diversi studi. Un'analisi recente basata su studi di coorte prospettici ha riportato che un aumento dell'assunzione di olio d'oliva di 25 g/giorno era associato ad una riduzione del rischio di CVD totale del 18% (RR = 0.82; 95% CI, 0.70-0.96) [135]. Lo studio PREDIMED ha testato due modelli dietetici mediterranei, integrati con olio extravergine di oliva o noci miste, rispetto ad una dieta di controllo, per la prevenzione primaria delle CVD in 7.447 uomini e donne privi di malattia cardiovascolare diagnosticata ma ad alto rischio CVD al basale [74]. Durante un periodo di follow-up medio di 4,8 anni, le diete di intervento hanno ridotto significativamente di circa il



30% i principali eventi (infarto del miocardio, ictus e morti per CVD), rispetto alla dieta di controllo (HR = 0,70; 95% CI, 0,54-0,92 per il gruppo sottoposto a DM integrata con olio extra vergine e HR = 0,72; 95% CI, 0,54-0,96 per il gruppo assegnato a DM integrata con noci). Questo studio ha fornito la prova più forte a sostegno dei benefici per la salute di una DM ricca di olio d'oliva o noci nella prevenzione primaria del CVD.

## ACIDI GRASSI POLINSATURI E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Gli acidi grassi polinsaturi sono costituiti da una catena carboniosa con due o più doppi legami. Come visto precedentemente, le due classi principali sono omega-6 ed omega-3 e comprendono gli acidi grassi essenziali, linoleico e  $\alpha$ -linolenico, ed i grassi da essi derivati ad elevato grado d'insaturazione con catena molta lunga.

L'acido linoleico, acido grasso essenziale precursore della serie n-6, è presente in abbondanza nel mondo vegetale, infatti è riscontrato prevalentemente negli oli estratti dai semi di soia, mais, girasole, zafferano e cotone [136].

L'acido  $\alpha$ -linolenico è il precursore della serie degli n-3 ed è l'acido grasso maggiormente presente nel mondo vegetale, in particolare nelle piante a foglia verde, nei legumi, nelle noci e in alcuni oli come quello di lino e di soia, nonché di estratti di colza e di ravizzone.

L'acido eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA) sono i più importanti acidi grassi a lunga catena della serie n-3 poiché svolgono nell'organismo umano funzioni strutturali e funzionali. In particolare, il DHA è il maggior componente dei fosfolipidi di membrana dei sinaptosomi cerebrali, nella retina e dei canali intramembrana del sodio; esso esercita un importante ruolo nello sviluppo e nella maturazione del sistema nervoso, del tessuto retinico e dell'apparato riproduttivo [137]. L'EPA, invece pur non essendo significativamente presente nei fosfolipidi cellulari, possiede un'importante attività funzionale essendo il precursore di alcuni eicosanoidi con effetti antiaggreganti opposti a quelli prodotti dai mediatori lipidici derivati dalla serie n-6 [138].

L'EPA e il DHA sono prodotti dal metabolismo dell'acido linolenico o possono essere introdotti come tali con la dieta. Le principali fonti di EPA e DHA preformato sono i pesci dei mari freddi e le carni di animali che di essi si nutrono: sardine, sardelle, sgombero, aringhe, salmone, tonno. Il contenuto di n-3 presente nella maggior parte degli alimenti di origine marina è determinata fondamentalmente dal tipo di alimentazione del pesce stesso [139]. L'assunzione di omega-3 può anche avvenire sotto forma di integratori dietetici preparati su concentrati di olio di pesce che contengono un rapporto variabile in EPA e DHA solitamente in percentuale non inferiore

all'85% ed in grado di fornire quantità relativamente elevate di PUFA in poche capsule per giorno. Dopo essere estratti dai pesci, gli oli sono arricchiti in EPA e DHA a livello industriale tramite procedure brevettate di distillazioni frazionate o estrazione con solventi. Gli oli così ottenuti possono contenere gli acidi grassi in forma libera oppure in forma di esteri etilici o, più raramente, di trigliceridi [140].

Attualmente le evidenze scientifiche sull'aumento del consumo di cibi ricchi in PUFA o integratori mettono in discussione i loro effetti sulla salute cardiovascolare. Una recente revisione sistematica su 49 studi randomizzati controllati ha mostrato che un aumento dell'apporto di PUFA probabilmente riduce leggermente il rischio di malattia coronarica ed eventi cardiovascolari, può ridurre leggermente il rischio di mortalità per CHD ed ictus, ma ha un effetto scarso o nullo sulla mortalità per malattie cardiovascolari o per tutte le cause [141].

### **ACIDI GRASSI OMEGA-6 E MALATTIA CARDIOVASCOLARE**

Gli acidi grassi PUFA della serie n-6, caratterizzati dalla presenza di almeno due doppi legami di cui il primo sul sesto carbonio a partire dal terminale metilico, sono i principali PUFA presenti negli oli vegetali, nelle noci e nei semi. I principali PUFA n-6 alimentari comprendono l'acido linoleico (LA) e l'acido arachidonico (AA): mentre il primo è il PUFA alimentare predominante, l'AA ha un livello di consumo molto basso. Alcuni studi controllati di intervento dietetico hanno dimostrato costantemente che la sostituzione di SFA o carboidrati con LA riduce il colesterolo LDL ed il rapporto colesterolo totale/HDL [116, 142]. Tuttavia, alcuni ricercatori hanno a lungo sostenuto che un'eccessiva assunzione di LA sia responsabile del rischio di malattie infiammatorie come CHD, citando diverse osservazioni sperimentali precedenti secondo cui l'AA, un metabolita dell'LA, potrebbe essere convertito in eicosanoide proinfiammatorio [143-145]. Tuttavia, evidenze scientifiche più recenti hanno rifiutato questa affermazione semplificata che ignora la complessità dell'intero metaboloma dell'AA. Tra tutta la varietà di metaboliti dell'AA, alcuni sono proinfiammatori, ma altri sono antinfiammatori [146-148]. Ad esempio, l'LA può essere convertito direttamente in alcuni derivati cardioprotettivi, come l'LA nitrato (LNO<sub>2</sub>) [146], ed alcuni metaboliti dell'AA possono avere un ruolo nella risoluzione dell'infiammazione [147, 148].

Non ci sono prove cliniche che l'aumento dell'assunzione di PUFA n-6 porti ad un aumento delle citochine proinfiammatorie negli esseri umani [147]. Un maggiore apporto di PUFA n-6 non è stato associato a biomarcatori infiammatori come proteina C-reattiva, interleuchina-6 e recettori TNF solubili 1 e 2 [149], mentre la concentrazione plasmatica di PUFA n-6 è

inversamente associata ai livelli di interleuchina-1 $\alpha$  proinfiammatoria e positivamente associata ai livelli di TGF- $\beta$  antinfiammatoria[150]. La maggior parte degli studi prospettici di coorte ha trovato un'associazione inversa tra assunzione di LA e rischio di CHD. Una recente meta-analisi basata su 13 studi di coorte con un totale di 310.602 individui e 12.479 eventi CHD ha mostrato che una maggiore assunzione di LA sia associata ad una riduzione del 15% del rischio di eventi coronarici (RR = 0.85; 95% CI, 0.78-0.92) e del 21% del rischio di decessi per CHD (RR = 0.79; 95% CI, 0.71-0.89) [151]. In una meta-analisi condotta da Harris et al. le concentrazioni di LA nel sangue/tessuto, biomarcatori dell'assunzione di LA, erano inversamente associate con CHD non fatale [152]. Diversi studi randomizzati controllati hanno valutato gli effetti delle diete ad alto contenuto di PUFA e a basso contenuto di SFA sugli eventi coronarici [145, 153]. Questi studi randomizzati controllati hanno fornito prove dirette degli effetti sul rischio di malattia coronarica nel sostituire gli acidi grassi SFA con PUFA n-6, dato che questa classe di acidi grassi PUFA, e soprattutto l'acido LA, è quella predominante nella dieta abituale. Sono stati condotti due precedenti studi randomizzati controllati condotti su popolazioni istituzionalizzate [154-157]: Il Wadsworth Hospital and Veterans Administration Center Study condotto da Dayton et al. è uno studio in doppio cieco ben controllato su 846 veterani maschi, il 26% dei quali con una storia di eventi cardiovascolari [154]. La dieta di intervento ha utilizzato oli ricchi di PUFA, tra cui mais, soia, cartamo e semi di cotone, in sostituzione di SFA. Di conseguenza, l'LA rappresentava rispettivamente il 38% degli acidi grassi totali nella dieta d'intervento ed il 10% in quella di controllo. Durante un follow-up medio di 8 anni, l'RR per morte improvvisa confrontando la dieta d'intervento rispetto alle diete di controllo è stato 0,74 (95% CI, 0,53-1,03). Il Finnish Mental Hospital Study, un vecchio studio di intervento randomizzato controllato che comprendeva protocolli di prevenzione primaria e secondaria [156, 157] aveva testato l'effetto dei PUFA n-6 derivati da olio di soia rispetto agli SFA, derivati principalmente da latticini, in 1.222 pazienti di ospedali psichiatrici con un follow-up medio di 6 anni. Una caratteristica unica di questo studio è stata che la *compliance* all'intervento è stata confermata da un forte aumento della concentrazione di LA nel tessuto adiposo. Come risultato, la dieta di intervento ad alto contenuto di PUFA, rispetto alla dieta di controllo ad alto contenuto di SFA, ha ridotto la CHD del 41% (RR = 0.59; 95% CI, 0.47-0.74). Oltre a questi due primi studi randomizzati controllati, anche altri due, l'Oslo Diet-Heart Study [158] e il British Medical Research Council Study [159], avevano osservato che l'aumento del consumo di PUFA, in sostituzione degli acidi grassi SFA, protegge contro la CHD. In conclusione,

prese nel loro insieme, esistono prove consistenti derivate da studi randomizzati di intervento dietetico e da studi di coorte prospettici che supportano fortemente l'associazione di un elevato apporto di PUFA n-6 (prevalentemente LA), in particolare in sostituzione degli SFA, con un minor rischio di CHD. In una recente analisi delle coorti del Nurses Health Study (NHS) e dell'Health Professionals Follow-Up Study, una maggiore assunzione di LA, sia rispetto agli SFA che ai carboidrati, è stata associata ad una inferiore mortalità totale e per CVD [133].

Gli omega-6 sono grassi polinsaturi fondamentali per molte funzioni fisiologiche, ma il loro effetto sul rischio di malattie cardiovascolari (CVD) è discusso. Una recente revisione, realizzata su 19 RCT per valutare gli effetti dell'aumento degli n-6 sulla malattia cardiovascolare e mortalità per tutte le cause, ha concluso che non ci sono prove sufficienti a dimostrare gli effetti degli acidi grassi omega-6 sebbene si ritenga possano essere di beneficio nelle persone ad alto rischio di infarto miocardico. L'aumento di grassi omega-6 riduce il colesterolo totale nel siero, ma non altre frazioni di grasso nel sangue o adiposità [160].

### **ACIDI GRASSI OMEGA-3 E MALATTIA CARDIOVASCOLARE**

Un PUFA della serie n-3 è acido grasso con più di un doppio legame di cui il primo si trova sul terzo carbonio a partire dal terminale metilico. I principali PUFA n-3 della dieta includono ALA di origine vegetale e PUFA n-3 a catena lunga, tra cui l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) derivati da pesci ed altri frutti di mare. L'interesse della ricerca sugli effetti cardiovascolari dei PUFA n-3 è stato stimolato dall'osservazione di un profilo lipidico favorevole ed un basso rischio di CHD nelle popolazioni indigene che vivono nella parte settentrionale della Groenlandia e che consumano una grande quantità di pesce [161]. Sono stati ampiamente studiati i tre principali effetti fisiologici dei PUFA n-3, cioè l'antiinfiammazione, l'elettrofisiologia del miocita e la fluidità della membrana cellulare [162-164]. In primo luogo, i PUFA n-3 possono essere convertiti in molecole di segnalazione biologicamente attive, come gli eicosanoidi (inclusi prostaglandine, trombossani e leucotrieni), epossidi, dioli e chetoni, attraverso percorsi che coinvolgono reazioni catalizzate da ciclossigenasi e lipossigenasi, ed in acidi grassi nitro attraverso la nitrificazione [162]. Queste molecole svolgono un ruolo importante nel sopprimere l'infiammazione e nelle azioni che promuovono la risoluzione dell'infiammazione. In secondo luogo, senza essere metabolizzati, i PUFA n-3 liberi possono influenzare direttamente i canali ionici delle membrane cellulari e l'elettrofisiologia dei miociti in modo acuto. In terzo luogo, l'incorporazione dei PUFA n-3 nelle membrane cellulari altera la fluidità di membrana ed interferisce con le funzioni delle proteine

associate alle membrane e con i recettori ormonali, esercitando effetti a lenta insorgenza e di lunga durata come l'antinfiammazione e l'antiaterogenesi [162, 165]. Attraverso uno o più di questi meccanismi, l'apporto di PUFA n-3 sarebbe in grado di influenzare molti fattori di rischio cardiovascolare in modo dose- e tempo- dipendente. I PUFA n-3 se consumati in dosi alimentari ed abitualmente, hanno mostrato un modesto effetto di abbassamento dei trigliceridi sierici [166], della frequenza cardiaca a riposo [167] e della pressione sanguigna [168]. Essi colpiscono in modo acuto i canali ionici delle membrane cellulari e quindi possiedono un potenziale effetto antiaritmico, che può essere un meccanismo alla base del suo effetto di prevenzione della morte cardiaca improvvisa [169, 170]. Gli effetti dell'assunzione di PUFA n-3 a lunga catena sugli outcome di CHD sono stati studiati sia in studi prospettici di coorte che in studi randomizzati controllati. Meta-analisi su studi prospettici di coorte suggeriscono generalmente un rischio più basso di CHD tra i partecipanti sani al basale con maggiore assunzione di PUFA n-3 a catena lunga o di pesce [131, 171]; l' RR confrontando il più alto con il più basso quantitativo di assunzione era 0.81 (95% CI, 0.70-0.92) per i pesci e 0.86 (95% CI, 0.75-0.97) per i PUFA n-3 [171]. Le associazioni inverse erano più forti per la morte causata da CHD rispetto a CHD non fatale [172, 173]. Gli studi randomizzati controllati hanno per lo più testato l'effetto di PUFA n-3 a lunga catena come integratori in pazienti con anamnesi di malattia cardiovascolare ed hanno dato risultati contrastanti. Una recente meta-analisi basata su 17 RCTs con 4.974 eventi CHD su 76.580 partecipanti ha riportato una RR riepilogativa di 0.94 (95% CI, 0.86-1.03) confrontando il gruppo di intervento con quello di controllo [131]. Al contrario, i risultati di alcune meta-analisi hanno indicato una significativa riduzione del rischio nel gruppo di intervento con PUFA n-3 per morte cardiaca improvvisa o morte per cause cardiache negli studi randomizzati controllati [131]. Le incongruenze hanno sollevato il dubbio che le prime stime degli effetti cardioprotettivi dei PUFA n-3 fossero troppo ottimistiche. Tuttavia, per interpretare gli studi di randomizzati controllati sull'integrazione di olio di pesce, in particolare quelli più recenti, si devono notare diverse limitazioni. In primo luogo, la maggior parte di questi studi sono stati condotti su popolazioni ad alto rischio di malattia cardiovascolare o in pazienti con malattia cardiovascolare già conclamata che stavano già ricevendo farmaci altamente efficaci come gli antipertensivi e statine [174], ed è complicato rilevare un potenziale piccolo beneficio degli integratori di olio di pesce al di là degli effetti di questi farmaci. In secondo luogo, gli studi randomizzati controllati recenti sono stati sostanzialmente sottodimensionati a causa della minore incidenza di eventi [175, 176]. In terzo luogo, la durata di alcuni di questi studi è stata

troppo breve perché le variazioni nell'assunzione di PUFA n-3 si equilibrino con il livello di acidi grassi nei tessuti [176]. Infine, data l'evidenza di un effetto soglia dell'assunzione di PUFA n-3, ci si aspettava che un'integrazione aggiuntiva di una bassa dose di PUFA n-3 avrebbe avuto un effetto minimo sulla morte per CHD in popolazioni con un'elevata assunzione abituale di PUFA n-3 a lunga catena [177]. Gli effetti di PUFA n-3 a lunga catena a base vegetale ed ALA sul rischio di malattia cardiovascolare sono stati meno caratterizzati. Le prove attuali indicano che ALA ha effetti favorevoli sul profilo lipidico simili a quelli di LA [178]. Una recente meta-analisi ha indicato che l'assunzione di ALA dietetico è stata associata ad un rischio modestamente inferiore di malattia cardiovascolare totale [179]. L'Alpha Omega Trial ha confrontato l'effetto della supplementazione di ALA (2 g/giorno) con l'acido oleico sulle malattie cardiovascolari ed ha riportato risultati non significativi [177]. Tuttavia, il numero di eventi in questo studio è stato modesto e l'ampio intervallo di confidenza del RR potrebbe includere un importante effetto benefico. Il Lyon Diet Heart Study, che ha testato l'effetto di una dieta di tipo mediterraneo ad alto contenuto di ALA rispetto ad una dieta controllo a basso contenuto di grassi, ha rilevato una riduzione del 70% della recidiva di CHD nel gruppo di intervento rispetto al gruppo controllo [98]. Tuttavia, l'effetto benefico osservato non può essere interamente attribuito all'elevato apporto di ALA, poiché l'intervento comprendeva anche consigli per la modifica di altri componenti della dieta. Studi epidemiologici che impiegano PUFA n-3 circolanti come biomarcatori oggettivi del livello di assunzione hanno generalmente prodotto associazioni inverse con il rischio di CHD. Una recente analisi di pooling, comprendente 19 coorti potenziali, ha trovato che livelli ematici più elevati di DHA, acido docosapentaenoico (DPA) ed ALA erano associati ad un rischio di morte per CHD significativamente più basso [180]. Analogamente alle osservazioni sull'assunzione di PUFA n-3 dalla dieta e dai supplementi di PUFA n-3, le associazioni con biomarcatori sono state più forti per la morte per CHD [181]. Diverse linee di evidenza supportano l'associazione inversa di PUFA n-3 totali a lunga catena circolanti con l'insufficienza cardiaca [182, 183] e fibrillazione atriale [130, 184, 185], mentre le prove riguardanti l'associazione tra ALA circolante ed insufficienza cardiaca sono in conflitto [186, 187]. Nell'insieme, quindi, vi è concordanza di prove da studi meccanicistici, studi di intervento dietetico controllati e studi prospettici sull'assunzione di alimenti e biomarcatori che i PUFA n-3, inclusi ALA e PUFA n-3 a lunga catena, siano protettivi verso la CHD, in particolare contro la morte per malattia cardiovascolare. Tuttavia, diversi limiti degli studi randomizzati controllati sono degni di nota; ad esempio, l'assunzione basale di PUFA n-3 dietetici, farmaci antipertensivi

e le statine ampiamente usati, e la limitata potenza statistica di diversi RCT. Pertanto, le attuali raccomandazioni per la prevenzione primaria delle malattie cardiovascolari si sono concentrate sul consumo regolare di pesce grasso piuttosto che sull'assunzione di integratori di olio di pesce. Una recentissima review, che ha incluso 79 RCT, ha valutato l'effetto degli omega-3 sulla salute cardiovascolare, sulla mortalità per tutte le cause e sui lipidi, concludendo che l'aumento nell'assunzione di EPA e DHA ha un effetto minimo o nullo sulla mortalità o sulla salute cardiovascolare, mentre l'assunzione di ALA potrebbe ridurre leggermente il rischio di eventi cardiovascolari, la mortalità per malattie coronariche e l'aritmia [160]

### **ACIDI GRASSI *TRANS* E MALATTIA CARDIOVASCOLARE**

I TFA (acidi grassi insaturi con uno o più legami doppi di carbonio in *trans*) si formano quando oli vegetali vengono parzialmente idrogenati e accorciati per formare margarina. Prove consistenti derivate da studi controllati di intervento dietetico dimostrano che i TFA, quando sostituiscono gli SFA o gli acidi grassi insaturi, aumentano il colesterolo LDL, riducono il colesterolo HDL, ed aumentano notevolmente il rapporto TC/HDL, che è un forte predittore del rischio di malattia cardiovascolare [116]. Inoltre, i TFA hanno un effetto negativo sulla funzione endoteliale, promuovono l'infiammazione, riducono le dimensioni delle particelle di colesterolo LDL e i livelli di lipoproteina(a), ognuno dei quali aumenta ulteriormente il rischio malattia CVD [188].

L'elevato rischio di CHD in relazione ad una maggiore assunzione di TFA è stato riportato per la prima volta nell'NHS [189] e confermato da studi prospettici di coorte successivi [190-192]. Studi che utilizzano biomarcatori di TFA hanno anche trovato che sia i TFA del tessuto adiposo che quelli circolanti erano positivamente associati al rischio di CHD [193-196]. Sono stati studiati diversi sottotipi di TFA (di diverse lunghezze della catena ed insaturazioni) ed isomeri (di simile lunghezza della catena e insaturazione, ma diversa localizzazione dei doppi legami). I dati attuali, utilizzando globuli rossi o tessuto adiposo, mostrano che gli isomeri *trans* a 18 atomi di carbonio sono rilevanti per l'aumento del rischio di CHD: Rispetto agli isomeri del 18:1 *trans*, gli isomeri *trans* del 18:2 sono più fortemente associati al rischio di CHD [194, 196-198]. Un recente studio condotto da Wang et al. [198] ha ulteriormente studiato in dettaglio diversi isomeri del 18:2 *trans*. Questi hanno osservato che gli isomeri *trans/cis* e *trans/trans* del 18:2 *trans* sono ciascuno significativamente associato ad un rischio più elevato di CHD, mentre il *cis/trans* 18:2 non è associato al rischio di CHD. Poiché i TFA prodotti industrialmente sono stati gradualmente eliminati dalla fornitura alimentare statunitense ed i livelli di TFA ematici nel

tempo sono diminuiti notevolmente [199], è aumentato l'interesse per i TFA derivante dai grassi dai ruminanti. Fino ad ora, la maggior parte degli studi prospettici non ha documentato associazioni significative tra l'assunzione [189, 191, 200, 201] o i biomarcatori [202-204] di questi TFA derivati dai grassi dei ruminanti ed il rischio cardiovascolare, ma una recente coorte del Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study ha riportato un'associazione inversa tra il livello di 16:1n-7 trans nelle membrane degli eritrociti ed il rischio di mortalità per CVD e morte cardiaca improvvisa [205]. Tuttavia, l'interpretazione di questi risultati è complicata sia per l'omissione di importanti fattori confondenti nel modello statistico, come ad esempio le variabili alimentari e la pressione sanguigna, sia per un potenziale problema di causalità inversa perché la coorte era composta da partecipanti ricoverati in ospedale per angiografia coronarica. Alcuni ricercatori hanno ipotizzato che i TFA provenienti da latticini, in particolare il 16:1n-7 trans, possono avere funzioni biologiche uniche ed effetti cardiometabolici favorevoli come la riduzione della sintesi epatica del grasso epatico e l'aumento della sensibilità all'insulina muscolare [206]. Tuttavia, data l'elevata correlazione tra 16:1n-7 trans e l'assunzione di latticini, è difficile distinguere gli effetti di questi TFA dagli effetti derivati dagli altri componenti dei latticini, come la vitamina D, i minerali, i gangliosidi e peptidi bioattivi.



## SCOPO DELLA TESI

Date le evidenze scientifiche sugli effetti benefici della DM nella prevenzione della malattia coronarica e l'associazione tra il profilo di acidi grassi ematici ed il rischio cardiovascolare, lo scopo dello studio è stato quello di valutare se anche in prevenzione secondaria la DM fosse in grado di modificare favorevolmente il profilo di acidi grassi ematici, ridurre i fattori di rischio metabolici e il marker infiammatorio (proteina C-reattiva) più efficacemente rispetto alla dieta convenzionale per il controllo dei fattori di rischio cardiovascolare usualmente raccomandata ai pazienti.

In particolare gli obiettivi specifici di questo studio sono stati:

1. Valutare la possibilità di modificare favorevolmente il profilo di acidi grassi ematici in pazienti con malattia coronarica attraverso l'adesione alla DM;
2. Valutare l'effetto della DM sui fattori di rischio classici per la patologia coronarica e sul marker infiammatorio proteina C-reattiva.

## MATERIALI E METODI

### LO STUDIO RISMeD

Lo studio **RISMeD** (Randomised Interventional Study on **M**editerranean Diet) si è svolto presso il Centro Cardiologico Monzino di Milano, IRCCS, tra il 2015 ed il 2018. Si tratta di uno studio di intervento randomizzato a gruppi paralleli, open-label condotto in conformità con le Norme di Buona Pratica Clinica dell'Unione Europea, in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Ogni soggetto selezionato è stato inserito nel programma di Ricerca solo successivamente alla sottoscrizione del modulo di consenso informato. Questo studio si proponeva di valutare se, in pazienti con malattia coronarica (CHD), l'adesione alla DM, personalizzata in termini di calorie e lipidi totali, potesse modificare favorevolmente il profilo di acidi grassi ematici e il bilancio ossidativo più efficacemente rispetto ad una dieta a ridotto tenore lipidico usualmente raccomandata nella prevenzione cardiovascolare.

### SOGGETTI

Lo studio ha previsto il reclutamento di maschi e femmine, di età compresa tra 30 e 75 anni, con una storia recente di rivascolarizzazione coronarica, randomizzati dopo la stabilizzazione clinica (almeno 60 giorni dopo qualsiasi procedura coronarica o evento). I criteri di esclusione utilizzati per la selezione dei candidati sono stati i seguenti: diagnosi di diabete, intolleranze alimentari, indice di massa corporea (IMC)  $<19$  o  $>33$ , pregressi tumori o malattie autoimmunitarie, assunzione di farmaci o integratori alimentari con probiotici, acidi grassi omega-3 o antiossidanti naturali o sintetici, alta aderenza alla dieta mediterranea (score MeDAS  $>10$ ).

### DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio ha previsto in totale 5 incontri per ogni paziente: un primo contatto in reparto per l'arruolamento, 2 visite mediche (la prima alla randomizzazione e la seconda alla fine dell'intervento dietetico, dopo 3 mesi dalla prima visita) e 4 visite nutrizionali (la prima alla randomizzazione, la seconda e la terza ad intervalli regolari di un mese, la quarta alla fine dell'intervento dietetico, dopo 3 mesi dalla prima visita). Di seguito è riportato lo schema della sequenza temporale dello studio. Nel dettaglio il protocollo ha previsto:

1. la verifica della compatibilità dei dati clinici con tutti i criteri di inclusione/esclusione e la valutazione del livello di aderenza alla DM al momento del primo contatto in reparto con il paziente (T<sub>i</sub>);
2. la convocazione dei pazienti, arruolati al ricovero, circa 2 mesi dopo l'intervento di rivascolarizzazione per essere sottoposti alla visita basale (T<sub>0</sub>) ed essere randomizzati ad una dieta standard per la riduzione del rischio cardiovascolare (gruppo di controllo) o ad una DM intensiva (gruppo di intervento);
3. il monitoraggio nutrizionale mensile con un rinforzo delle raccomandazioni dietetiche di tutti i pazienti randomizzati (T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>);
4. dopo 3 mesi di intervento visita medica e visita nutrizionale (T<sub>3</sub>);
5. la rilevazione dei dati antropometrici (peso, circonferenza vita e IMC) e clinici, la misurazione dei parametri ematici (FA ematici, colesterolo, LDL-C, HDL-C, trigliceridi, glucosio) e la determinazione degli indici sistemici di stress ossidativo e di attività infiammatoria di tutti i partecipanti in due tempi differenti: alla visita basale (T<sub>0</sub>), al termine del trattamento dietetico (T<sub>3</sub>).

## INTERVENTO NUTRIZIONALE

I partecipanti allo studio sono stati randomizzati a due diete differenti: ad un gruppo è stata formulata una DM intensiva, all'altro una dieta convenzionale per rischio cardiovascolare (CD). La DM è stata personalizzata in termini di calorie totali. Questa dieta includeva: pesce almeno 3 volte a settimana; legumi 2-3 volte a settimana; verdura cruda o cotta, 2 volte al giorno (preferibilmente ricca in antiossidanti); frutta 3 volte al giorno; olio extravergine d'oliva 30-40g al giorno; vino rosso: uomini 1-2 bicchieri al giorno, donne 1 bicchiere al giorno; non più di 150g a settimana di carne rossa. È stato scoraggiato il consumo di salumi, dolci, burro e formaggi stagionati. Il gruppo di controllo ha invece ricevuto una dieta convenzionale per la riduzione del rischio cardiovascolare e, personalizzata in termini di calorie totali, con particolare attenzione alla riduzione dei grassi saturi e degli alimenti ricchi in zuccheri semplici. Le diete sono state elaborate col software "terapia Alimentare" della DS Medica Milano. Tutti i pazienti sono stati monitorati mensilmente con un rinforzo delle raccomandazioni alimentari al fine di mantenere un'adeguata adesione al trattamento dietetico. Nella tabella 1 sono riportate le medie delle scomposizioni in macro- e micro- nutrienti giornalieri delle due diete assegnate; in media le DM assegnate sono significativamente più elevate in termini di energia totale, proteine vegetali, carboidrati semplici, grassi totali, grassi insaturi e monoinsaturi, fibra

alimentare (sia solubile che insolubile) e della maggior parte di vitamine e minerali. Non ci sono, invece, differenze tra i due interventi dietetici in termini di grassi saturi totali.

## **METODI DI VALUTAZIONE E MONITORAGGIO NUTRIZIONALE**

### **QUESTIONARIO DELLE FREQUENZE ALIMENTARI (FFQ)**

Durante il primo incontro sono state indagate in modo approfondito le abitudini alimentari dei pazienti, facendo riferimento all'anno precedente l'inclusione nello studio. A questo scopo è stato utilizzato il questionario semi-quantitativo delle frequenze alimentari (FFQ) sviluppato nello studio European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) e validato per la popolazione italiana. Il questionario è composto da 248 domande relative ad alimenti e bevande comunemente consumati in Italia. Per ogni alimento l'FFQ rileva la frequenza di consumo (giornaliera, settimanale, mensile, annuale, mai o quasi mai), la porzione abitualmente consumata e per molti alimenti il tipo di condimento utilizzato ed il tipo di cottura. Per valutare la quantità della porzione, per alcuni alimenti il questionario si avvale di tre fotografie della ricetta a diverse grammature. I dati dei questionari FFQ compilati online sono stati elaborati dall'Unità di Epidemiologia Nutrizionale presso l'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano attraverso l'utilizzo di un software appositamente sviluppato. Tale programma permette di calcolare la frequenza di consumo degli alimenti, le grammature riportate ad un giorno e la scomposizione dei nutrienti sempre riferita alla giornata, dati utilizzati per le analisi statistiche.

### **VALUTAZIONE DELL'ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA**

Per valutare il livello basale di aderenza alla DM sono stati utilizzati due diversi metodi: lo score proposto da Trichopoulou et al. [88], calcolato sull'FFQ EPIC, e lo score ricavato dal questionario sviluppato dai ricercatori dello studio spagnolo PREDIMED [207] i cui risultati sono stati pubblicati nel 2013 [74]. Quest'ultimo strumento è stato utilizzato anche per valutare la *compliance* all'intervento dietetico dopo 3 mesi di intervento. Questo questionario, come mostrato nella seguente tabella, è composto da 14 domande inerenti le frequenze di consumo di diversi gruppi di alimenti. Lo score finale (compreso tra 0 e 14) si ottiene sommando i punteggi attribuiti alle risposte per ciascun item del questionario. Se la risposta soddisfa i criteri predefiniti viene assegnato un punteggio pari a 1, viceversa pari a 0. Uno score finale di 14 punti indica la massima aderenza alla DM.

Alimenti e frequenza di consumo		Criteri per l'assegnazione di 1 punto*
1	Usa olio d'oliva come principale grasso quando cucina?	Sì
2	Quanto olio d'oliva consuma in un giorno? ( <i>incluso l'olio usato per friggere, condire le insalate, pasti fuori casa, ecc.</i> )?	≥ 4 cucchiari
3	Quante porzioni di verdure consuma al giorno? (1 porzione = 200g, si considera il contorno come mezza porzione)	≥ 2 porzioni
4	Quanti frutti ( <i>includendo anche le spremute</i> ) consuma al giorno?	≥ 3 frutti
5	Quante porzioni di carne rossa, hamburger, o prodotti processati (prosciutto, salsicce, ecc.) consuma a settimana? (1 porzione = 100-150g)	≤ 2 porzioni
6	Quante porzioni di burro, margarina o crema consuma al giorno? (1 porzione = 12g)	< 1 porzione
7	Quante bevande zuccherate/gassate beve alla settimana?	< 2 bicchieri
8	Quanto vino beve a settimana?	7-14 bicchieri
9	Quante porzioni di legumi consuma a settimana? (1 porzione = 150g)	≥ 3 porzioni
10	Quante porzioni di pesce o molluschi consuma alla settimana? (1 porzione = 100-150g pesce; 4-5 unità o 200g di molluschi)	≥ 3 porzioni
11	Quante volte a settimana consuma dolci confezionati o paste (non fatte in casa), come torte, biscotti, o crostate?	< 3 volte
12	Quante porzioni di frutta secca (incluse le noccioline) consuma alla settimana? (1 porzione = 30g)	≥ 1 porzione
13	Preferisce consumare carne di pollo, tacchino o coniglio al posto di carne di vitello, maiale, hamburger o salsicce?	Sì
14	Quante volte a settimana consuma verdura, pasta, riso, o altri piatti di stagione cucinati con soffritto? ( <i>preparazione base con pomodoro, cipolla o porri, aglio e condita con olio d'oliva</i> )	≥ 2 volte
* 0 punti se questi criteri non sono soddisfatti		

Questionario MeDAS con Criteri per l'attribuzione di un punto

## DIARIO ALIMENTARE

A tutti i partecipanti è stato chiesto di compilare, tra il primo ed il secondo mese di intervento, un diario alimentare su 7 giorni per valutare l'aderenza alla dieta assegnata. I pazienti sono stati invitati a registrare ogni tipo di alimento o bevanda assunto nell'arco di una settimana, annotandone il peso a crudo e al netto degli scarti, l'orario ed il luogo di consumo. Successivamente, per rilevare la composizione in nutrienti, il diario così ottenuto è stato inserito nel software "Terapia Alimentare". Solo 93 diari sono risultati adeguatamente compilati per poter effettuare questa analisi.

## ANALISI DI LABORATORIO

Per valutare il metabolismo lipidico classico sono stati determinati su campioni di plasma: colesterolo totale, colesterolo-HDL, trigliceridi con un metodo enzimatico colorimetrico; le concentrazioni di LDL sono state calcolate attraverso la formula di Friedewald [ $HDL = TC - (HDL + (TAG/5))$ ]. La glicemia a digiuno è stata misurata su campioni di plasma con il metodo enzimatico glucosio-ossidasi; la proteina C-reattiva ad alta sensibilità (hs-CRP) è stata determinata su campioni di siero mediante immunoturbidimetria. Tutte queste analisi sono state eseguite presso il laboratorio clinico del Centro Cardiologico Monzino.

## DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI EMATICI

Di tutti i pazienti sono state raccolte aliquote di sangue intero in provette contenente acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) come anticoagulante per la determinazione degli acidi grassi ematici e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ . I campioni sono poi stati processati ed analizzati in gas-cromatografia [208] presso il dipartimento di scienze farmacologiche e biomolecolari dell'università degli studi di Milano. I lipidi totali sono stati estratti a partire da 500  $\mu\text{l}$  litri di sangue intero con cloroformio/metanolo 2:1. I metil esteri degli acidi grassi ottenuti (FAME) sono stati preparati per transesterificazione di aliquote di lipidi totali (300  $\mu\text{g}$ ) con 3ml di soluzione 3 N di metanolo in acido cloridrico posta in un bagno a secco termostato alla temperatura di  $90^{\circ}\text{C}$  per 1 ora e successive estrazioni con 6 ml di acqua e 3 ml di n-esano per tre volte. In questa fase avviene la transmetilazione in ambiente acido e l'idrolisi degli acidi grassi presenti nel sangue intero. I FAME così ottenuti sono stati analizzati previa iniezione di circa 0,5  $\mu\text{l}$  di ogni campione al gascromatografo. Il gas-cromatografo utilizzato è il GC 2010 (Shimadzu) dotato di iniettore PTV, detector FID e collegato ad un software DDS 1000 dedicato per la raccolta e l'elaborazione dati. Il gas di trasporto è l'elio, la colonna utilizzata è una DB-FFAP (Agilent) con una lunghezza di 15 m, un diametro interno di 10 mm e un film di 0,10  $\mu\text{m}$  di spessore. La temperatura della camera della colonna è stata programmata secondo il seguente schema: un incremento di  $25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  da  $150^{\circ}\text{C}$  a  $205^{\circ}\text{C}$ , isoterma a  $205^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti, un ulteriore incremento di  $25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  sino alla temperatura di  $220^{\circ}\text{C}$ , isoterma a  $220^{\circ}\text{C}$  per 2 minuti e, infine, un aumento di  $8^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  sino a  $248^{\circ}\text{C}$  che viene mantenuto per i successivi 9 minuti. Essendo stato utilizzato un gascromatografo rapido, con un tempo di corsa per ogni campione di 19 minuti e 80 secondi, la pressione risulta essere maggiore rispetto ai classici gascromatografi, mantenendosi intorno ai 7,5 bar. Questa sequenza programmata

permette la rilevazione degli acidi grassi con numero di carbonio compreso tra 14 e 24. I cromatogrammi ottenuti, elaborati con l'apposito software, permettono di esprimere i dati come valore percentuale sul totale degli acidi grassi, il metodo più rappresentativo per descrivere gli acidi grassi. La seguente tabella riporta sia la nomenclatura dei singoli acidi grassi ematici analizzati, che le classi di appartenenza.

ACIDI GRASSI			
Classi	Nome comune	Nomenclatura IUPAC	Abbreviazione
Acidi grassi saturi (SFA)	Acido palmitico	Acido esadecanoico	16:0
	Acido stearico	Acido ottadecanoico	18:0
	Acido arachidico	Acido eicosanoico	20:0
	Acido beenico	Acido docosanoico	22:0
	Acido lignocerico	Acido tetracosanoico	24:0
Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)	Acido palmitoleico	Acido esadeca-9-enoico	16:1n-7
	Acido oleico	Acido octadeca-9-enoico	18:1n-9
	Acido vaccenico	Acido octadeca-11-enoico	18:1n-7
	Acido gadoleico	Acido eicosa-9-enoico	20:1
	Acido erucico	Acido docosa-13-enoico	22:1n-9
	Acido nervonico	Acido tetracos-15-enoico	24:1n-9
Acidi grassi polinsaturi (PUFA)	Acido Mead	Acido eicosa-5,8,11-trienoico	20:3n-9
	Acido linoleico (LA)	Acido octadeca-9,12-dienoico	18:2n-6
	Acido gamma-linolenico (GLA)	Acido octadeca-6,9,12-trienoico	18:3n-6
	Acido diomo-gamma-linolenico (DHGLA)	Acido eicosa-8,11,14-trienoico	20:3n-6
	Acido arachidonico (AA)	Acido eicosa-5,8,11,14-tetraenoico	20:4n-6
	Acido adrenico	Acido docosa-7,10,13,16-tetraenoico	22:4n-6
	Acido docosapentaenoico (DPA n-6)	Acido docosa-4, 7,10,13,16-pentaenoico	22:5n-6
	Acido alfa-linolenico (ALA)	Acido octadeca-9,12,15-trienoico	18:3n-3
	Acido eicosapentaenoico (EPA)	Acido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico	20:5n-3
	Acido docosapentaenoico (DPA n-3)	Acido docosa-7,10,13,16,19-pentaenoico	22:5n-3
	Acido docosaesaenoico (DHA)	Acido docosa-4,7,10,13,16,19-esaenoico	22:6n-3
CLASSI ACIDI GRASSI			
SFA	Somma AG Saturi		
MUFA	Somma AG monoinsaturi		
PUFA	Somma AG polinsaturi		
n-6	Somma di tutti gli AG n-6		
n-3	Somma di tutti gli AG n-3		
n-6 HUFA	Somma di AG n-6 con più di 18 C e 3 doppi legami		
n-3 HUFA	Somma di AG n-3 con più di 18 C e 3 doppi legami		
I.I. (Indice Insaturazione)	Somma dei prodotti di AG (%) x il numero dei suoi doppi legami		
Indice n-3 HUFA %	100 X n-3 HUFA / (n-3 HUFA + n-6 HUFA)		

## ANALISI STATISTICA

Un calcolo preliminare per valutare della dimensione del campione considerava come end-point uno score di rischio coronarico (Fatty Acid Score, FAS) messo a punto in un nostro studio preliminare combinando i livelli dei cinque acidi grassi che differivano maggiormente tra soggetti con malattia coronarica e controlli sani (acido palmitico 16:0, acido palmitoleico 16:1 n-7, acido ecosatrienoico 20:3 n-9, acido arachidonico 20:4 n-6 e acido erucico 22:1 n-9) [209]. Un campione finale di 60 soggetti per gruppo avrebbe fornito una potenza statistica dell'80% di rilevare come significativa (con  $\alpha=0.05$ ) una differenza tra gruppi pari al 48% di quella rilevata tra pazienti coronarici e controlli sani nel nostro studio preliminare.

Sono state applicate due diverse strategie di analisi dei dati:

- "*Intention to treat*", la valutazione dell'effetto dovuto alle indicazioni dietologiche assegnate indipendentemente dalle variazioni della dieta effettivamente riscontrate nei soggetti durante il trattamento nell'intera popolazione ( $n=120$ );
- "*per protocol*", definita come l'analisi condotta in un sottogruppo di soggetti, escludendo i pazienti con bassa *compliance* dal gruppo DM (cioè pazienti che hanno variazione di score MeDAS tra T3 e T0  $< 1$ ) e pazienti del gruppo DC che hanno una variazione di score MeDAS tra T3 e T0  $> 2$ .

Le variabili continue sono state presentate come  $\text{media} \pm \text{SD}$ , le variabili non distribuite come una normale sono state rappresentate con mediana e range interquartile (IQR), mentre le variabili categoriche come frequenza e valore percentuale.

Il confronto tra i gruppi "controllo" vs "dieta mediterranea" è stato effettuato attraverso uno Student t-test per gruppi indipendenti per le variabili normalmente distribuite, mentre con un Wilcoxon Rank-Sum test per quelle non distribuite come normali.

Le variabili categoriche sono state comparate usando il Test del Chi-quadrato.

Il confronto delle variabili tra basale e trattamento è stato effettuato con l'utilizzo dello Student T-Test per dati appaiati.

Le correlazioni tra variabili sono state determinate utilizzando lo Spearman's rank test.

Tutti i test erano a due code, ed un P value minore di 0.05 era richiesto per una significatività statistica.

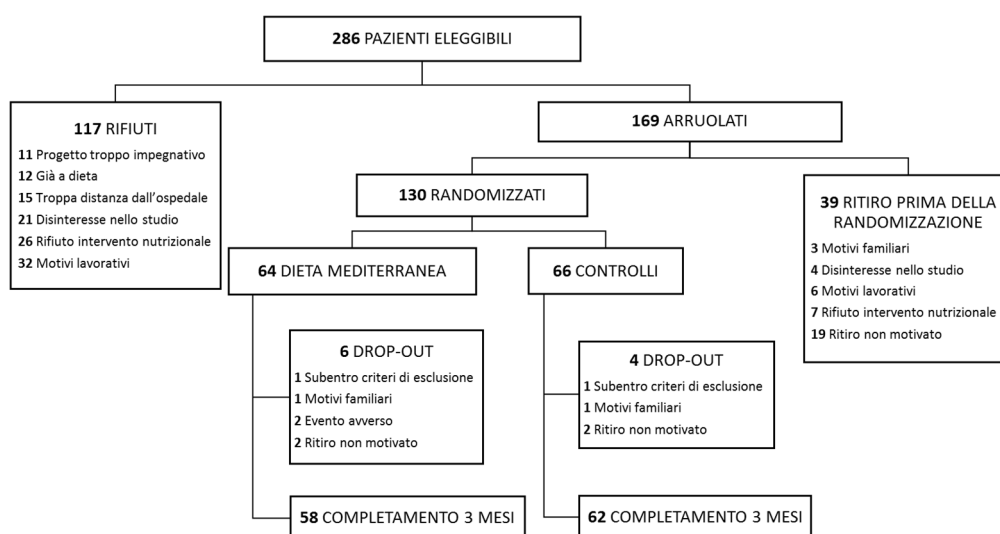
Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il pacchetto statistico SAS V.9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).



# RISULTATI

## ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI

Nei primi mesi del 2015 è stata ottenuta l'approvazione del Comitato Etico e del Comitato Scientifico del Centro Cardiologico Monzino IRCCS ed in collaborazione con i reparti di Cardiologia Interventistica e di Cardiochirurgia (medici e staff infermieristico), è stato attivato un accesso ai database clinici ed amministrativi, per la selezione dei soggetti che rispondevano ai criteri di inclusione, ed è stato predisposto il reclutamento dei pazienti. In tutto sono state analizzate circa 1700 cartelle elettroniche e selezionati 295 pazienti eleggibili; i criteri di esclusione più frequenti erano diabete o altre patologie, ed età maggiore ai 75 anni. Durante il primo contatto in reparto (Ti) ai pazienti è stato somministrato un questionario alimentare breve composto da 14 domande, formulato dagli autori dello studio spagnolo PREDIMED, per valutare la loro aderenza alla DM. Coloro che, al momento del primo contatto in reparto, presentavano un punteggio di aderenza alla DM superiore a 10 sono stati esclusi ( $n = 9$ ). Dei restanti 286 pazienti eleggibili, 169 sono stati arruolati per partecipare allo studio, mentre 117 hanno rifiutato l'invito per le seguenti motivazioni: 32 per motivi lavorativi, 26 per rifiuto dell'intervento nutrizionale, 21 per disinteresse nel progetto di ricerca, 15 perché residenti lontano dall'ospedale, 12 perché già in terapia dietetica, 11 perché hanno ritenuto il progetto di ricerca troppo impegnativo. Dei 169 pazienti arruolati durante la degenza, 39 hanno ritirato il consenso a partecipare allo studio prima della visita T0, per cui sono stati randomizzati 130 pazienti, 66 al trattamento di controllo e 64 alla DM. La figura seguente riporta il diagramma di reclutamento dello studio.



Tutti i pazienti hanno eseguito i prelievi e le visite previste durante il primo incontro ed hanno completato i questionari delle frequenze alimentari. Durante il periodo di follow up (T0-T3) si sono verificati 6 drop-out nel gruppo di pazienti assegnati alla DM (1 per criteri di esclusione subentrati dopo T0, 1 per motivi familiari, 2 per eventi avversi e 2 senza motivare il ritiro) e 4 drop-out nel gruppo di pazienti assegnati al controllo (1 per criteri di esclusione subentrati dopo T0, 1 per motivi familiari e 2 senza motivare il ritiro). L'intervento nutrizionale è stato completato, quindi, da 120 pazienti (58 DM, 62 controlli).

## CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE

Nella tabella 2 sono riportati i dati antropometrici e clinici dei pazienti, nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento, rilevati al momento della randomizzazione alla prima visita (T0). Nel complesso, i partecipanti erano adulti di mezza età (età media  $62,23 \pm 9,52$  anni), per lo più maschi (86,9%). I parametri di laboratorio sono risultati inclusi nei range di normalità ad eccezione della glicemia a digiuno che supera il limite normalmente riconosciuto per la normoglicemia (100 mg/dL); tuttavia, nessun paziente diabetico è stato arruolato. La maggior parte della popolazione era ipertesa (71,54%) e dislipidemica (79,2%) in terapia farmacologica e mediamente in sovrappeso (IMC medio  $27,47 \pm 3,46$ ). Pochi partecipanti (11,5%) erano fumatori attuali ma la maggior parte della popolazione era ex-fumatore (59,23%). Non ci sono state differenze significative tra i due gruppi per nessuna delle caratteristiche al basale compreso il profilo degli acidi grassi ematici (mostrati nella prima parte della tabella 8), ad eccezione dei livelli di colesterolo totale più elevati nel gruppo assegnato alla DM ( $162.59 \pm 28.53$  vs  $172.7 \pm 29.14$ ,  $p=0.05$ ), di glicemia basale più elevati nel gruppo di controllo ( $103.68 \pm 11.25$  vs  $100.08 \pm 9.07$ ,  $p=0.05$ ), percentuale di soggetti iperglicemici maggiore nel gruppo di controllo (36.36% vs 15.63%,  $p = 0.007$ ) e rapporto AA/DHGLA più elevato nei soggetti randomizzati a dieta convenzionale ( $7.16 \pm 1.84$  vs  $6.37 \pm 1.47$ ,  $p=0.01$ ).

## ASSOCIAZIONE TRA ABITUDINI ALIMENTARI E PROFILO DI ACIDI GRASSI EMATICI AL TEMPO 0

Sono state valutate, al tempo basale, le correlazioni tra acidi grassi ematici ed abitudini alimentari espresse come gruppi di alimenti (g/die) e di nutrienti (g/die, mg/die o  $\mu\text{g/die}$ ) stimate mediante il questionario EPIC. La tabella 3a mostra i coefficienti di correlazione di Spearman (vengono riportati solo i coefficienti significativi) tra i gruppi di alimenti e gli acidi grassi ematici, mentre la tabella 3b mostra i coefficienti di correlazione di Spearman tra la

scomposizione in nutrienti e gli acidi grassi ematici. È da notare che la maggior parte dei gruppi di alimenti correla con uno o più acidi grassi ematici.

Di particolare rilevanza per quanto riguarda i gruppi di alimenti sono le correlazioni positive tra:

- consumo di pesce, DHA ed omega 3 (sia n-3 totali che n-3 HUFA e indice n-3 HUFA);
- consumo di frutta secca, ALA e, più debolmente, LA;

Per quanto riguarda, invece, le correlazioni tra nutrienti della dieta ed acidi grassi sono da segnalare le seguenti correlazioni positive:

- intake di proteine, lipidi animali e colesterolo della dieta con l'acido palmitico (16:0) ed i grassi saturi totali (SFA) ematici;
- intake di acido linolenico della dieta e ALA ematico;
- intake di alcol e acido palmitoleico (16:1);
- intake di sodio e acido palmitico (16:0), arachico (20:0), palmitoleico (16:1) e SFA totali;
- intake di retinolo e acido palmitico (16:0), palmitoleico (16:1), SFA totali e rapporto n-6/n-3;
- intake di vitamina E, acido arachico (20:0) e  $\alpha$ -linolenico (18:3 n-3, ALA);
- intake di vitamina D e indice n-3 HUFA.

## COMPLIANCE ALL'INTERVENTO DIETETICO

La tabella 4, mostra invece le differenze tra le diete effettivamente seguite dai pazienti, valutate attraverso la scomposizione in nutrienti dei diari compilati dai pazienti. I pazienti randomizzati a DM assumono significativamente più proteine vegetali, acidi grassi insaturi e monoinsaturi, fibra alimentare (in particolare di tipo insolubile) e livelli più elevati della maggior parte di vitamine e minerali.

Per valutare il livello di *compliance* mantenuta dai partecipanti allo studio rispetto alla dieta assegnata, sono state effettuate delle correlazioni tra gli score di aderenza alla DM, MDS e MeDAS, calcolati sia per le diete proposte che per i diari compilati dai pazienti durante il trattamento dietetico. Come si può osservare nella tabella 5, in tutta la popolazione, la correlazione tra i due score di aderenza alla DM calcolati sulle diete assegnate è significativamente forte ( $r=0.715$ ,  $p < .0001$ ). La correlazione tra score MeDAS della dieta assegnata e del diario compilato è significativa ( $r=0.524$ ,  $p < .0001$ ), mentre la correlazione tra score MDS della dieta e del diario è più debole ( $r=0.265$ ,  $p=0.01$ ).

## MODIFICHE DEI FATTORI DI RISCHIO CLASSICI DOPO 3 MESI DI TRATTAMENTO DIETETICO

Nella tabella 6 sono riportati i dati antropometrici e clinici dei pazienti nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento, misurati al tempo T0, al tempo T3 e la variazione T3-T0. Si può osservare che l'aderenza alla DM, secondo il punteggio MeDAS, da T0 a T3 è aumentata in entrambi i gruppi: da  $7.14 \pm 1.75$  a  $8.16 \pm 1.75$  ( $p < 0.0001$ ) nel gruppo nel gruppo DM e da  $7.36 \pm 1.43$  a  $9.91 \pm 1.75$  ( $p < 0.0001$ ) nel gruppo DC. Tuttavia, l'aumento nel gruppo DM è stato significativamente superiore a quello del gruppo di controllo (delta score T3-T0: DC  $1.03 \pm 1.78$ ; vs DM  $2.6 \pm 2.18$ ,  $P = 0.0001$ ). Entrambi gli interventi dietetici sono stati in grado di ridurre notevolmente peso, IMC, circonferenza della vita, colesterolo totale, colesterolo LDL, TG e PAS. Ad eccezione dell'aumento di punteggio MeDAS non è stata raggiunta alcuna differenza significativa tra i due gruppi.

Un'ulteriore analisi è stata fatta considerando tutto il campione, valutando quanto i pazienti abbiano modificato le loro abitudini alimentari verso uno stile mediterraneo, indipendentemente dal gruppo di trattamento. La tabella 7 mostra i coefficienti di correlazione tra le variazioni dei fattori di rischio metabolici classici (T3-T0) e la variazione dello score MeDAS (T3-T0); in questo caso il cambiamento dello score MeDAS risulta correlato negativamente con variazioni di IMC ( $R = -0.34$ ,  $p = 0.0001$ ), circonferenza della vita ( $R = -0.25$ ,  $p = 0.005$ ), colesterolo totale ( $R = -0.41$ ,  $p < 0.0001$ ), colesterolo LDL ( $R = -0.37$ ,  $p < 0.0001$ ), trigliceridi ( $R = -0.26$ ,  $p = 0.005$ ) ed hs-CRP ( $R = -0.22$ ,  $p = 0.01$ ).

## MODIFICHE DEGLI ACIDI GRASSI EMATICI DOPO 3 MESI DI TRATTAMENTO DIETETICO

La tabella 8 descrive i livelli acidi grassi ematici determinati nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento, misurati al tempo T0 e al tempo T3, e la variazione T3-T0. Considerando l'intero campione, dopo 3 mesi di follow-up la maggior parte degli acidi grassi sono variati in modo significativo. In particolare, gli acidi grassi saturi totali ( $p < 0.0001$ ), l'acido palmitico ( $p = 0.004$ ), stearico ( $p < 0.0001$ ) e 20:0 ( $p < 0.0001$ ) diminuiscono significativamente, mentre crescono in modo significativo i monoinsaturi totali ( $p = 0.003$ ) ed in particolare l'acido oleico ( $p = 0.003$ ); globalmente i polinsaturi non variano pur aumentando significativamente gli n-6 ( $p = 0.017$ ).

Gli effetti più importanti riguardano le differenze significative riscontrate tra la variazione degli AG nei due bracci:

- I livelli di acidi grassi omega-3 (sia n-3 che n-3 HUFA) variano in modo diverso nei due gruppi ( $p=0.03$ ) ed in particolare crescono in DM, non variano in CD;
- Sia la variazione dell'indice di insaturazione che la variazione dell'AA sono significativamente diverse nei due gruppi (positive in DM, nulle in CD).

Considerando i due bracci di trattamento, sono inoltre da segnalare:

- in entrambi i gruppi diminuiscono in modo significativo i saturi totali, mentre il palmitico decresce significativamente solo nel gruppo DM (senza raggiungere la differenza significativa tra i gruppi);
- nel gruppo CD i monoinsaturi totali crescono in modo significativo, in particolare cresce l'acido oleico, mentre diminuisce l'acido palmitoleico;
- nel gruppo DM aumentano i polinsaturi totali e gli n-6; ciò è dovuto ad un aumento di AA e DHA.

## CORRELAZIONE TRA ADERENZA ALLA DIETA MEDITERRANEA E ACIDI GRASSI EMATICI, DOPO 3 MESI DI INTERVENTO DIETETICO

La tabella 9 mostra i coefficienti di correlazione degli AG ematici determinati al T3 con lo score MeDAS ed i suoi singoli item rilevati al T3, considerando tutti i pazienti, indipendentemente dal braccio di trattamento.

La maggior parte degli acidi grassi correla con lo score MeDAS dopo 3 mesi di trattamento. Di rilevante interesse sono le seguenti correlazioni:

- All'aumentare della *compliance* all'intervento dietetico diminuiscono i livelli di 16:0 (acido palmitico) e 16:1 (acido palmitoleico), 20:3 n-9, 22:4 n-6, 22:5 n-6, ed il rapporto n-6/n-3;
- Parallelamente, all'aumentare della *compliance* all'intervento dietetico, aumentano i livelli di 24:1, omega-3 (sia n-3 che n-3 HUFA) ed in particolare di EPA.

Considerando i singoli item che compongono lo score MeDAS, le correlazioni di maggiore interesse osservate sono:

- Un consumo maggiore di carne rossa correla con livelli più bassi di polinsaturi totali e di acido linoleico (LA);

- Un consumo maggiore di frutta secca è correlato a più alti livelli di polinsaturi totali, sia omega 3 (n-3 e n-3 HUFA) che omega 6 e, in particolare, un aumento di ALA, EPA, DPA-n3, LA ed indice di insaturazione;
- Un consumo maggiore di frutta secca è correlato negativamente con monoinsaturi totali (in particolare: acido palmitoleico, acido oleico, acido vaccenico) e saturi totali (in particolare acido palmitico);
- Alti livelli di olio d'oliva sono correlati con bassi livelli di acido palmitoleico e più alti livelli di 24:1;
- Il consumo di pesce sembra far variare globalmente i livelli di polinsaturi (sia della serie n-3 che n-6); in particolare una quantità maggiore di pesce è correlata con più alti livelli di EPA, DHA e con più bassi livelli di 20:3 n-9, AA, 22:4 n-6 e 22:5 n-6;
- Un maggior consumo di verdure è correlato con bassi livelli di 22:5n6 e con alti livelli di EPA;
- Infine, un maggior consumo di vino correla con alti livelli di saturi totali, in particolare acido palmitico ed EPA, e con bassi livelli di polinsaturi totali, omega 6 (sia n-6 che n-6 HUFA) ed AA.

In un'ulteriore analisi *'per protocol'*, sono stati esclusi dal gruppo DM i pazienti con bassa *compliance*, cioè quelli che hanno avuto tra T0 e T3 una variazione di score MeDAS < +1. Sono stati inoltre esclusi dal gruppo CD i pazienti che hanno variato la propria dieta in senso troppo "mediterraneo", cioè quelli che hanno avuto tra T0 e T3 un incremento di score MeDAS > 2.

Escludendo i pazienti sopra descritti, dopo 3 mesi di follow-up, si mantiene la variazione significativa della maggior parte degli acidi grassi singoli. In particolare gli acidi grassi saturi totali sono diminuiti significativamente, mentre i monoinsaturi totali sono cresciuti in modo significativo. Da segnalare, inoltre, la riduzione dell'acido palmitico e palmitoleico ed un aumento significativo dell'acido oleico, risultato simile a quello osservato nell'analisi *intention to treat*.

I risultati che riguardano le differenze significative riscontrate tra la variazione degli AG nei due bracci non cambiano:

- L'aumento dell'indice di insaturazione è significativamente maggiore nel gruppo di pazienti assegnato alla DM rispetto a quelli assegnati alla CD;
- Gli omega-3 (sia n-3 che n-3 HUFA) sono variati in modo diverso nei due gruppi (crescono in DM non variano in CD).

Considerando i due bracci di trattamento, sono da segnalare:

- Una diminuzione dei saturi totali in entrambi i gruppi, ad eccezione dell'acido palmitico che decresce solo nel gruppo trattato DM, in accordo con quanto osservato nell'analisi precedente;
- A differenza dei risultati ottenuti su tutto il campione, nel sottogruppo considerato, si osserva una diminuzione significativa dell'acido palmitoleico nel gruppo DM.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nello studio RISMeD, abbiamo valutato gli effetti della DM rispetto ad una dieta convenzionale per la riduzione del rischio cardiovascolare in pazienti con malattia coronarica, al fine di valutare gli effetti della DM in prevenzione secondaria. Esistono infatti in letteratura scientifica molti studi che valutano l'effetto della dieta mediterranea in prevenzione primaria, ma pochi studi di intervento in prevenzione secondaria. Il primo è stato il Lyon Heart Study, uno degli studi più importanti in merito e con la natura di un vero e proprio trial clinico di intervento condotto su pazienti con pregresso infarto miocardico, il quale ha dimostrato che in una popolazione post-infartuata l'utilizzo di una dieta Mediterranea arricchita con un grammo di acido  $\alpha$ -linolenico era in grado di ridurre il rischio di morte, infarto non fatale e end-point clinici secondari [98]. Un altro studio molto importante sempre in prevenzione secondaria è stato il GISSI-prevenzione, che ha dimostrato come la dieta Mediterranea sia in grado di dimezzare il rischio di mortalità e di ricorrenze cardiovascolari in pazienti ad alto rischio, indipendentemente da farmaci assunti e stili di vita [210]. Più recentemente invece sono stati avviati altri due studi di intervento in prevenzione secondaria, l'AUSMED Study [211] e il CORDIOPREV [212] di cui sono stati pubblicati pochi risultati.

In questo studio le diete sono state somministrate ai pazienti per tre mesi e l'aderenza alla DM è stata quantificata attraverso lo score MeDAS, derivato da un questionario di 14 domande somministrato sia al tempo basale che al termine del trattamento. Sono stati valutati diversi fattori coinvolti nell'aterosclerosi, tra cui i classici fattori di rischio metabolico, infiammazione e profilo lipidico plasmatico.

Come osservato precedentemente, le due diete assegnate differivano in numerosi nutrienti e *compliance* dei pazienti, che è stata poi confermata attraverso l'analisi delle scomposizioni dei diari compilati durante il trattamento dietetico. Ciò che emerge in particolare è un apporto significativamente più elevato di proteine e composti derivati da verdura, frutta, cereali e legumi quali fibre, antiossidanti e minerali nel gruppo che ha seguito la DM rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, si può osservare un intake più elevato di grassi insaturi e monoinsaturi generalmente più abbondanti nel pesce e nella frutta secca. Dalle correlazioni tra gli score calcolati sia per le diete assegnate che per i diari compilati, è stato verificato un buon livello di *compliance* dei pazienti rispetto alla dieta loro assegnata.



Pure essendo gli studi randomizzati e controllati, come questo, di solito considerati i più informativi e con minori errori dato che il trattamento viene assegnato in modo casuale ed il paziente non ne è a conoscenza [213], tuttavia, gli studi di intervento sulla dieta riservano diversi problemi, in quanto l'aderenza dei pazienti alla dieta assegnata è molto variabile e dipende anche dai gusti o dalle preferenze alimentari personali. Inoltre, sono disponibili pochi metodi per controllare quantitativamente l'adesione alla dieta [214]. Al fine di minimizzare gli errori nei risultati dovuti alla variabilità dell'adesione alla dieta, sono state applicate due diverse strategie di analisi dei dati: "*Intention to treat*", definita come l'analisi dell'intera popolazione e "*per protocol*", definita come l'analisi di un sottogruppo della popolazione selezionato successivamente. Infatti, considerando l'intera popolazione dopo tre mesi di intervento dietetico, non solo il gruppo randomizzato a DM, ma anche quello di controllo, ha mostrato un significativo aumento di aderenza alla DM (calcolato attraverso lo score MeDAS). L'aumento dell'aderenza alla DM nel gruppo DC, dovuto sia al fatto che per motivi di tipo etico sono state fornite loro indicazioni su una corretta alimentazione sia al fatto che probabilmente alcune raccomandazioni tipiche della DM sono note ed i pazienti particolarmente sensibili all'argomento le adottano una volta a conoscenza della patologia coronarica, avrebbe potuto mascherare le differenze tra gruppi. Per questo motivo è stato definito un sottogruppo specifico escludendo coloro che nel gruppo assegnato alla DM hanno mantenuto una bassa *compliance* alla dieta assegnata e coloro che hanno aumentato notevolmente la loro aderenza alla dieta mediterranea pur essendo stati assegnati alla dieta di controllo. La strategia di analisi sia '*intention to treat*' che '*per protocol*' è comune agli studi di intervento. Infatti il primo approccio preserva i vantaggi della randomizzazione e dimostra gli effetti di una strategia di trattamento. D'altra parte, l'approccio per protocollo è più appropriato per valutare l'effetto del modello dietetico mediterraneo.

Nel nostro studio entrambi gli interventi dietetici sono stati associati a riduzioni statisticamente significative del peso, dell'IMC, della circonferenza periombelicale, della pressione sanguigna e delle modifiche del profilo lipidico plasmatico, in particolare le concentrazioni di colesterolo totale, colesterolo LDL e TG sono diminuite dopo tre mesi di intervento dietetico. Al contrario, non sono state osservate modifiche nei livelli di colesterolo HDL e glicemia. Questi risultati dimostrano che un controllo dell'alimentazione porta ad un miglioramento dei fattori di rischio. È da notare che per motivi etici la DC è la dieta convenzionale per il controllo dei fattori di rischio cardiovascolare, per cui le differenze tra le diete riguardano solo alcuni gruppi peculiari

della dieta mediterranea. Ciò nonostante, una maggior variazione dello score MeDAS di aderenza alla DM è associata ad un maggiore effetto della diminuzione dell'IMC, della circonferenza periombelicale, e delle caratteristiche dei lipidi ematici, indipendentemente dal gruppo di randomizzazione.

Nessuno degli interventi dietetici proposti ha ridotto le concentrazioni di glicemia, ma in questo studio non sono stati arruolati pazienti diabetici ed i livelli di glicemia erano vicini al range di accettabilità già al basale. Questi dati sono in accordo con uno studio precedente su pazienti con CHD in cui sia la DM che uno stile di vita con dieta ipolipidica hanno portato ad una riduzione dell'IMC, della circonferenza della vita e della pressione sanguigna dopo tre mesi di trattamento, con nessuna modificazione dei livelli di colesterolo HDL o di glicemia [51]; studi di intervento che valutano gli effetti della dieta mediterranea in pazienti in prevenzione secondaria sono ad ora scarsi. Il fatto che non si sia verificata nessuna variazione del colesterolo HDL potrebbe essere spiegato dal breve periodo di trattamento (tre mesi), che potrebbe non essere sufficiente a modularne i livelli; tuttavia si verifica una diminuzione significativa sia di colesterolo totale che di colesterolo LDL ed un miglioramento del rapporto LDL/HDL che sono importanti nella valutazione del rischio cardiovascolare. Nonostante i benefici riconosciuti alla DM, spesso si ritiene che questo stile alimentare porti ad un aumento di peso a causa del suo elevato apporto in grassi, derivati dal consumo di olio d'oliva e frutta secca, e cereali. Nonostante questa convinzione, alcuni studi precedenti [57] e lo studio RISMeD hanno confermato che la DM non induce un aumento di peso. Al contrario, porta ad una diminuzione dell'IMC e della circonferenza della vita. Questi risultati possono essere spiegati dal fatto che un elevato consumo di verdura, olio d'oliva e frutta secca inducono la termogenesi, aumentano la sazietà e diminuendo l'assunzione di energia da altre fonti attraverso la compensazione alimentare [56, 58, 215].

È già noto che l'infiammazione, come detto, siano dei fattori riconosciuti per lo sviluppo delle patologie cardiovascolari [216]. In questo studio, considerando l'intera popolazione, abbiamo valutato l'effetto della DM sul marker infiammatorio proteina C-reattiva ma non sono state osservate modifiche dopo tre mesi di intervento dietetico. Tuttavia, è stata riscontrata una significativa correlazione negativa tra la variazione del punteggio MeDAS e la variazione di hs-PCR: maggiore è l'aumento dell'aderenza alla DM, maggiore è la diminuzione del livello di hs-PCR. Questi risultati suggeriscono che la hs-PCR potrebbe essere coinvolta o almeno rappresentare un marker dei meccanismi antiaterogenici della DM, supportando l'ipotesi che

l'effetto antinfiammatorio della DM giochi un ruolo importante nella cardioprotezione. I dati ottenuti sono in accordo con i risultati precedentemente riportati, in diversi studi clinici, e con la recente meta-analisi pubblicata da Schwingshackl ed Hoffmann [217]. Ad esempio, nello studio osservazionale INTERCATH è stata evidenziata una forte correlazione negativa tra il punteggio di aderenza al MD e l'hs-PCR in pazienti sottoposti ad angiografia coronarica [103]. Allo stesso modo, Lahoz et al. hanno evidenziato una correlazione inversa tra lo score MeDAS e l'hs-PCR nella popolazione spagnola sana [218]. I ricercatori hanno osservato che questa relazione era fortemente correlata ad un maggiore consumo di verdura, frutta, latticini e pesce. In questo studio abbiamo valutato anche la variazione del profilo lipidico di acidi grassi ematici dopo intervento dietetico perché gli acidi grassi ematici sono considerati uno dei biomarker modificabili del rischio cardiovascolare [219]. Nelle analisi condotte nel nostro studio, la DM appare modificare in senso protettivo la concentrazione ematica degli acidi grassi; questo effetto della dieta non è comunque da attribuirsi alla perdita di peso, in quanto l'aggiustamento per questo fattore non modifica i risultati. I dati più rilevanti sono stati la riduzione globale degli acidi grassi saturi ematici, cosa ritenuta potenzialmente importante nella riduzione del rischio cardiovascolare [78, 220], pur non essendoci una correlazione diretta tra assunzione di SFA con la dieta e SFA ematici. In letteratura una recente meta-analisi mostra che non c'è alcuna relazione tra l'assunzione di SFA e il rischio di CHD [159]. Oltre a quella con i saturi totali abbiamo osservato l'associazione inversa tra aderenza alla DM e acido palmitico che in studi precedenti è risultato l'acido grasso saturo più fortemente associato al rischio di CHD [209, 221]. Parallelamente nel nostro campione, la dieta mediterranea appare modificare in senso positivo la concentrazione degli n-3 totali, in modo più marcato rispetto alla dieta convenzionalmente raccomandata ai pazienti in prevenzione secondaria. Sebbene l'effetto benefico ottenuto grazie all'assunzione di supplementi con omega-3 ed omega 3 dietetici sia stato messo in discussione dai risultati presentati in una recente revisione sistematica condotta su 79 RCTs [160] e da una metanalisi presentata su *JAMA cardiology* [222], gli acidi grassi omega 3 ed i polinsaturi ematici in generale, sono stati considerati universalmente come protettivi nei confronti delle malattie cardiovascolari [223-225].

È stato inoltre osservato un aumento dell'aderenza alla DM correlato all'aumento di n-6 e, più in particolare di AA, spesso descritto in letteratura come proinfiammatorio [144, 145]. Nel nostro studio questo aumento non è, tuttavia, risultato associato ad un incremento degli indici infiammatori come la proteina hs-PCR reattiva. Questo dato è in linea con quanto riportato da

studi scientifici che mettono in discussione il ruolo proinfiammatorio per lungo tempo attribuito ai metaboliti dell'LA (precursore dell'AA) e dell'AA. Alcuni dei loro metaboliti, infatti, sembrano avere addirittura un ruolo antiinfiammatorio [147, 148].

Il limite di questo studio, essendo uno studio controllato randomizzato, è stata la presenza di diversi problemi metodologici, come la breve durata dello studio, l'alto tasso di abbandono, la difficoltà nell'arruolamento dei casi di CHD, la bassa o insufficientemente *compliance* dei partecipanti ed i confondenti nella dieta di intervento.

In sintesi, nel nostro studio di intervento, una maggiore aderenza alla DM si è dimostrata in grado di modificare in senso protettivo il profilo degli acidi grassi ematici dei pazienti con CHD più efficacemente rispetto alla dieta convenzionalmente prescritta per la riduzione del rischio cardiovascolare. In particolare dopo soli tre mesi di trattamento, l'aumento di omega-3 è risultato significativamente maggiore nei pazienti randomizzati al trattamento con DM indipendentemente dalla perdita di peso. Parallelamente la DM è risultata capace di ridurre molti dei fattori di rischio metabolici ed il marker infiammatorio proteina C-reattiva anche in pazienti con terapia ottimizzata per il controllo dei fattori di rischio.

## TABELLE

**TABELLA 1:** Scomposizione in macro- e micro-nutrienti giornalieri delle due diete assegnate

	DC	DM	<i>p-value</i>
	(n=66)	(n=64)	
Energia totale (kcal)	1583.10±130.52	1698.68±148.94	<.0001
Proteine totali (g)	74.98±6.77	72.62±6.95	0.05
Animali (g)	42.14±6.70	36.90±4.83	<.0001
Vegetali (g)	30.39±4.25	34.67±4.22	<.0001
Carboidrati totali (g)	213.85±24.28	217.15±21.39	0.41
Semplici (g)	82.85±16.88	94.08±12.98	<.0001
Complessi (g)	118.18±16.66	111.73±14.02	0.02
Grassi totali (g)	46.05±5.54	58.87±5.61	<.0001
Saturi (g)	10.47±1.79	10.58±1.44	0.69
Insaturi (g)	6.35±1.35	8.65±1.37	<.0001
Monoinsaturi (g)	23.05±3.50	33.61±3.34	<.0001
Colesterolo (mg)	169.51±39	135.62±27.5	<.0001
Etanolo (g)	3.5(0.1;15.9)	12.6(0.1;14.6)	0.99
Fibra alimentare (g)	28.94±5.00	34.62±5.26	<.0001
Solubile (g)	6.29±1.35	7.65±1.55	<.0001
Insolubile (g)	17.00±3.15	21.62±3.53	<.0001
Acido ascorbico (mg)	206.87±66.85	262.16±67.58	<.0001
Acido folico (µg)	347.89±83	409.37±89.6	<.0001
Retinolo (µg)	1450.69±295.9	1899±311.2	<.0001
Biotina (µg)	42.35±9.26	47.98±5.26	<.0001
Tiamina (mg)	0.9(0.8;1.1)	1(0.9;1.1)	0,02
Riboflavina (mg)	1.52±0.6	1.52±0.2	0.97
Niacina (mg)	18.78±2.6	19.26±1.9	0.23
Calciferolo (µg)	2.2(1.1;3)	2.1(1.4;2.5)	0.42
Tocoferolo (mg)	12.32±2.36	17.15±1.50	<.0001
Menadione (µg)	170.91±67.03	216.55±64.01	0,0001
Sodio (mg)	1376.57±403.2	1096.42±233.3	<.0001
Potassio (mg)	3423.9±382.2	4001.66±370.4	<.0001
Ferro (mg)	12.98±1.9	14.39±1.8	<.0001
Calcio (mg)	552.54±148.9	608.93±134.1	0,025
Fosforo (mg)	1209.56±182.3	1315.11±161.7	0,0007
Magnesio (mg)	278.29±32.61	318.26±33.72	<.0001
Calcio/fosforo (mg)	11.30±2.45	13.15±2.31	<.0001
Carico glicemico	106.23±15.04	107.90±10.91	0.56

Le variabili sono espresse come media ± DS o mediana (range interquartile q1-q3). p-value significativo per p<0.05

**TABELLA 2:** Dati antropometrici e clinici dei pazienti nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento misurati al tempo basale. (Media  $\pm$  deviazione standard per le variabili numeriche e n e % per le variabili categoriche)

	T0			
	Tutti N=130	DC N=66	DM N=64	p-value
Sesso (n, %)				
- Uomo	113 (86.92)	59 (89.39)	54 (84.38)	0.39
Età	62.23 $\pm$ 9.52	61.46 $\pm$ 11.55	63.02 $\pm$ 6.82	0.35
Peso (Kg)	79.21 $\pm$ 12.45	80.81 $\pm$ 12.61	77.56 $\pm$ 12.15	0.13
Altezza (m)	1.7 $\pm$ 0.09	1.7 $\pm$ 0.08	1.69 $\pm$ 0.09	0.39
Indice di Massa Corporea (Kg/m <sup>2</sup> )	27.47 $\pm$ 3.46	27.82 $\pm$ 3.59	27.11 $\pm$ 3.31	0.24
Circonferenza periombelicale (cm)	98.03 $\pm$ 9.8	99.03 $\pm$ 9.82	97.01 $\pm$ 9.75	0.24
Fumo (n, %)				0.26
- Ex-fumatore	77 (59.23)	40 (60.61)	37 (57.81)	
- Fumatore	15 (11.54)	10 (15.15)	5 (7.81)	
- Mai fumatore	38 (29.23)	16 (24.24)	22 (34.38)	
Attività fisica (n, %)				0.38
- Intensa	29 (22.31)	15 (22.73)	14 (21.88)	
- Media	41 (31.54)	23 (34.85)	18 (28.13)	
- Scarsa	38 (29.23)	15 (22.73)	23 (35.94)	
- Nulla	22 (16.92)	13 (19.79)	9 (14.06)	
Colesterolo totale (mg/dl)	167.57 $\pm$ 29.16	162.59 $\pm$ 28.53	172.7 $\pm$ 29.14	<b>0.05</b>
HDL colesterolo (mg/dl)	50.85 $\pm$ 13.02	51.88 $\pm$ 13.54	49.78 $\pm$ 12.48	0.36
LDL colesterolo (mg/dl)	93.84 $\pm$ 25.45	88.5 $\pm$ 23.61	99.34 $\pm$ 26.27	0.01
Trigliceridemia (mg/dl)	114.44 $\pm$ 57.66	111.08 $\pm$ 51.99	117.91 $\pm$ 63.21	0.50
Dislipidemia (n, %)	103 (79.23)	55 (83.33)	48 (75)	0.24
Glicemia Basale (mg/dl)	101.91 $\pm$ 10.35	103.68 $\pm$ 11.25	100.08 $\pm$ 9.07	<b>0.05</b>
Iperglicemia (n, %)	34 (26.15)	24 (36.36)	10 (15.63)	<b>0.007</b>
PAS (mmHg)	132.35 $\pm$ 18.04	131.88 $\pm$ 19.28	132.83 $\pm$ 16.8	0.76
PAD (mmHg)	79.42 $\pm$ 10.16	79.86 $\pm$ 9.46	78.97 $\pm$ 10.9	0.61
Ipertensione (n, %)	93 (71.54)	45 (68.18)	48 (75)	0.38
hs-PCR (mg/dl)	1.59 $\pm$ 2.09	1.63 $\pm$ 2.45	1.55 $\pm$ 1.66	0.81
Score MeDAS	7.25 $\pm$ 1.6	7.14 $\pm$ 1.75	7.36 $\pm$ 1.43	0.42

HDL: lipoproteine ad alta densità; LDL: lipoproteine a bassa densità; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; hs-PCR: Proteina C-reattiva ad alta sensibilità; MeDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener by Martinez-Gonzalez et al. [207]

**TABELLA 3A:** Coefficienti di correlazione di Spearman tra i gruppi di alimenti del questionario EPIC e gli acidi grassi ematici (%). In diversi toni di rosso sono indicate le correlazioni positive; in diversi toni di blu sono indicate le correlazioni negative; sono omessi i coefficienti di correlazione non significativi

[illegible]

VARIABILI ALIMENTARI (g/die)	16:0	18:0	20:0	16:1	18:1	18:1 n-7	22:1	24:1	20:3 n-9	18:2 n-6	18:3 n-6	20:3 n-6	20:4 n-6	22:4 n-6	22:5 n-6	18:3 n-3	20:5 n-3	22:5 n-3	22:6 n-3	SFA totali	MUFA totali	PUFA totali	I.I.	n-6	n-3	n-6/n- 3	n-3 HUFA	n-6 HUFA	Indice n-3 HUFA %
Yogurt												-0.19																	
Formaggio fresco	0.25			0.26															- 0.19	0.29		-0.26	- 0.21						
Formaggio stagionato															0.19														-0.18
Carne di manzo				0.19																									
Carne di vitello						0.19										-0.21													
Pollame			0.18				0.20																						
Tacchino			0.18				0.20																						
Carne processata																-0.19	-0.27								- 0.18				-0.26
Frattaglie																			- 0.20						- 0.22	0.22	-0.20		-0.21
Pesce		-0.18		-0.19							-0.23		-0.28	-0.29	-0.29		0.20		0.34						0.21	-0.22	0.25	-0.24	0.41
Crostacei, molluschi								-0.27		-0.18																			
Uova										-0.22												-0.30							
Prodotti a base di soia	-0.20			-0.26						0.28												0.18							
Pizza	0.18																		0.18			- 0.18							
Torte crostate, paste								-0.18																					
Biscotti									-0.18																				
Cioccolato, caramelle					-0.22																-0.21								
Confetteria	0.23			0.30						-0.25												-0.18		- 0.19					
Gelato			0.19				0.19								0.25														
Olii di semi		0.27																											-0.19
Olio di oliva					0.22				-0.19												0.29								



VARIABILI ALIMENTARI (g/die)	16:0	18:0	20:0	16:1	18:1	18:1 n-7	22:1	24:1	20:3 n-9	18:2 n-6	18:3 n-6	20:3 n-6	20:4 n-6	22:4 n-6	22:5 n-6	18:3 n-3	20:5 n-3	22:5 n-3	22:6 n-3	SFA totali	MUFA totali	PUFA totali	I.I.	n-6	n-3	n-6/n-3	n-3 HUFA	n-6 HUFA	Indice n-3 HUFA %
Olio extravergine di oliva			0.23																			0.19							
Burro				0.19		0.26		-0.26																					
Maionese, salse								-0.26	-0.21								-0.25	-0.18	-						-	0.24	0.26	-0.24	-0.20
Bevande gasate zuccherate					0.19											-0.21	-0.28		-						-	0.25	0.23	-0.24	-0.23
Vino		-0.19		0.18													0.21												0.19
Superalcolici				0.27												-0.18													

Nessuna associazione significativa è stata osservata tra germogli, pasta, pane integrale, carne di maiale, carne ovina, carne equina, carne di capra, snack, zuppe, margarina, zucchero/miele/confetture, succhi di frutta e verdura, caffè/tè/caffè decaffeinato, birra/sidro, tuberi, cipolla e aglio, agrumi, altri frutti, macedonia, prodotti a base di pesce, carne di coniglio, salatinì, brodo, altri grassi animali e gli acidi grassi ematici; l'acido gadolenico (20:1), l'acido beenico (22:0) e l'acido lignocerico (24:0) non hanno mostrato alcuna associazione significativa con le variabili indipendenti.

**TABELLA 3B:** Coefficienti di correlazione di Spearman tra la scomposizione in nutrienti del questionario EPIC e gli acidi grassi ematici (%). In diversi toni di rosso sono indicate le correlazioni positive; in diversi toni di blu sono indicate le correlazioni negative; sono omessi i coefficienti di correlazione non significativi

Nutrienti	16:0	18:0	20:0	16:1	24:1	20:3 n-9	20:3 n-6	20:4 n-6	22:4 n-6	18:3 n-3	20:5 n-3	22:6 n-3	SFA totali	PUFA totali	I.I.	n-3	n-6/n-3	n-3 HUFA	n-6 HUFA	Indice n-3 HUFA %
Acqua (g/die)				0,18		-0,19														
Proteine animali (g/die)	0,28					-0,20							0,18							
Lipidi animali (g/die)	0,23			0,19		-0,18						-0,20	0,22	-0,18	-0,21	-0,21		-0,20		-0,18
Lipidi vegetali (g/die)			0,18	-0,20					0,19											
Saturi totali (g/die)	0,18												0,20							
Colesterolo (mg/die)	0,28										-0,18		0,19	-0,19	-0,26	-0,20		-0,19		
Acido oleico (g/die)			0,18																	
Acido linolenico (g/die)									-0,19	0,21										
Amido (g/die)							0,19													
Glucidi solubili (g/die)						-0,20														
Fibra alimentare (g/die)									-0,18	0,23										
Alcool (g/die)		-0,27		0,23							0,22									0,23
Calcio (mg/die)	0,19					-0,18														
Sodio (mg/die)	0,28		0,20	0,19									0,22		-0,18					
Potassio (mg/die)						-0,22			-0,20											
Fosforo (mg/die)	0,18																			
Zinco (mg/die)													0,18							
Riboflavina (mg/die)						-0,26														
Niacina (mg/die)									-0,20											
Vitamina C (mg/die)						-0,27														
Vitamina B6 (mg/die)						-0,22			-0,22											
Acido folico (µg/day)			0,18			-0,19														
Retinolo eq (µg/die)	0,19					-0,22		-0,19	-0,18				0,23		-0,18				-0,18	
Retinolo (µg/die)	0,26			0,26	-0,18					-0,18		-0,24	0,24	-0,30	-0,24	-0,23	0,18	-0,22		
Beta Carotene (µg/die)				-0,23		-0,23			-0,23											

Nutrienti	16:0	18:0	20:0	16:1	24:1	20:3 n-9	20:3 n-6	20:4 n-6	22:4 n-6	18:3 n-3	20:5 n-3	22:6 n-3	SFA totali	PUFA totali	L.L.	n-3	n-6/n-3	n-3 HUFA	n-6 HUFA	Indice n-3 HUFA %
Vitamina E (mg/die)			0,18	-0,18					-0,19	0,19										
Vitamina D (µg/die)								-0,26	-0,27										-0,28	0,26

Nessuna associazione significativa è stata osservata tra proteine totali, proteine vegetali, lipidi totali, MUFA, PUFA totali, altri PUFA, LA, glucidi disponibili, ferro, tiamina e acidi grassi ematici. Analogamente anche gli acidi grassi ematici 22:0, 24:0, 18:1, 18:1 n-7, 20:1, 22:1, 18:2 n-6, 18:3 n-6, 22:5 n-6, 22:5 n-3, MUFA totali e n-6 totali non hanno mostrato correlazioni significative con le altre variabili indipendenti. Pertanto, questi dati non sono stati riportati.

**TABELLA 4:** Scomposizione in macro- e micro-nutrienti giornalieri dei diari alimentari su 7 giorni compilati dopo 1,5 mesi di intervento

	DC (n=46)	DM (n=47)	p-value
Energia totale (kcal)	1548.41±281.1	1631.28±403.3	0.25
Proteine totali (g)	66.98±15.2	69.42±16.5	0.46
Animali (g)	37.73±11.6	36.3±11.2	0.55
Vegetali (g)	25.65±7.5	31±9.9	<b>0.004</b>
Carboidrati totali (g)	196.3±47.4	207.95±53.5	0.27
Semplici (g)	73.5±24.7	81.25±24	0.13
Complessi (g)	105.19±30.5	111.04±34.5	0.39
Grassi totali (g)	52.66±16.5	56.63±18.2	0.28
Saturi (g)	13.33±5.9	12.81±5	0.65
Insaturi (g)	7.39±3.5	9.34±4.2	<b>0.02</b>
Monoinsaturi (g)	23.68±8.8	27.1±9.2	<b>0.07</b>
Colesterolo (mg)	154.86±57.2	157.32±68.9	0.86
Etanolo (g)	4.4(0.1;16.9)	9.2(0.4;13.8)	0.91
Fibra alimentare (g)	20.83±7.7	25.06±8.1	<b>0.01</b>
Solubile (g)	4.46±1.8	4.96±1.7	0.16
Insolubile (g)	11.88±5	15.14±5.4	<b>0.003</b>
Acido ascorbico (mg)	133.5(101;182.5)	136.3(120.1;229.1)	0.12
Acido folico (µg)	249.76±105.4	307.17±121.2	<b>0.02</b>
Retinolo (µg)	1018.38±533	1331.75±617.7	<b>0.01</b>
Biotina (µg)	32.34±12.8	43.95±27.6	<b>0.01</b>
Tiamina (mg)	0.87±0.3	0.92±0.2	0.34
Riboflavina (mg)	1.18±0.4	1.27±0.4	0.26
Niacina (mg)	15.17±4.6	17.23±4.1	<b>0.025</b>
Calciferolo (µg)	1.8(0.8;4)	2.7(1.2;4.7)	0.12
Tocoferolo (mg)	10.41±3.3	12.79±3.7	<b>0.001</b>
Menadione (µg)	100.5(57.2;184.3)	167.9(104.4;236)	<b>0.003</b>
Sodio (mg)	1308.9±482.8	1189.27±469.3	0.22
Potassio (mg)	2784.11±860.1	3258.25±919.2	<b>0.01</b>
Ferro (mg)	10.69±3.5	12.39±3.5	<b>0.02</b>
Calcio (mg)	508.21±217.3	536.31±181.6	0.49
Fosforo (mg)	1028.14±287.9	1135.48±294.3	0.07
Magnesio (mg)	228.54±82.3	265.16±79.1	<b>0.03</b>
Calcio/fosforo (mg)	9.26±4	10.99±4	<b>0.04</b>
Carico glicemico	98.49±29.4	106.63±31.1	0.27

Le variabili sono espresse come media ± DS o mediana (range interquartile q1-q3). p-value significativo per p<0.05

**TABELLA 5:** Coefficienti di correlazione tra gli score di aderenza alla dieta mediterranea (MeDAS e MDS) calcolati sia sulle diete assegnate che sui diari alimentari su 7 giorni compilati dopo 1,5 mesi di intervento

	<b>r</b>	<b>p-value</b>
<b>Score Dieta/Dieta MeDAS - MDS</b>	0.715	<b>&lt;.0001</b>
<b>Score Dieta/Diario MeDAS</b>	0.524	<b>&lt;.0001</b>
<b>Score Dieta/Diario MDS</b>	0.266	<b>0.01</b>

MeDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener by Martinez-Gonzalez et al. [207]; MDS: Mediterranean Diet Score by Trichopolou et al. [88]

**TABELLA 6:** Dati antropometrici e clinici dei pazienti nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento, misurati al tempo T0, al tempo T3 e variazione T3-T0. (I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard)

	T0			T3			Differenza T3-T0						
	Tutti N=130	DC N=66	DM N=64	Tutti N=120	DC N=62	DM N=58	Tutti N=120	<i>p</i> -value vs T0	DC N=62	<i>p</i> -value vs T0	DM N=58	<i>p</i> -value vs T0	<i>p</i> -value tra gruppi
Peso (Kg)	79.21 $\pm$ 12.45	80.81 $\pm$ 12.61	77.56 $\pm$ 12.15	76.12 $\pm$ 12	77.08 $\pm$ 11.8	75.09 $\pm$ 12.22	-3.24 $\pm$ 3.69	<b>&lt;.0001</b>	-3.58 $\pm$ 4.25	<b>&lt;.0001</b>	-2.87 $\pm$ 2.98	<b>&lt;.0001</b>	0.55
Indice di Massa Corporea (Kg/m <sup>2</sup> )	27.47 $\pm$ 3.46	27.82 $\pm$ 3.59	27.11 $\pm$ 3.31	26.39 $\pm$ 3.33	26.57 $\pm$ 3.34	26.21 $\pm$ 3.33	-1.12 $\pm$ 1.23	<b>&lt;.0001</b>	-1.23 $\pm$ 1.39	<b>&lt;.0001</b>	-1.01 $\pm$ 1.04	<b>&lt;.0001</b>	0.54
Circonferenza periombelicale (cm)	98.03 $\pm$ 9.8	99.03 $\pm$ 9.82	97.01 $\pm$ 9.75	95.08 $\pm$ 9.25	95.83 $\pm$ 9.24	94.29 $\pm$ 9.28	-3.25 $\pm$ 3.36	<b>&lt;.0001</b>	-3.13 $\pm$ 3.25	<b>&lt;.0001</b>	-3.37 $\pm$ 3.49	<b>&lt;.0001</b>	0.76
Colesterolo totale (mg/dl)	167.57 $\pm$ 29.16	162.59 $\pm$ 28.53	172.7 $\pm$ 29.14	158.36 $\pm$ 34.3	154.77 $\pm$ 32.01	162.19 $\pm$ 36.44	-8.83 $\pm$ 24.7	<b>0.0002</b>	-7.6 $\pm$ 23.38	<b>0.013</b>	-10.1 $\pm$ 26.3	<b>0.0047</b>	0.68
HDL colesterolo (mg/dl)	50.85 $\pm$ 13.02	51.88 $\pm$ 13.54	49.78 $\pm$ 12.48	50.97 $\pm$ 13.25	51.26 $\pm$ 14.45	50.66 $\pm$ 11.94	-0.22 $\pm$ 6.85	0.72	-0.52 $\pm$ 7.22	0.57	0.1 $\pm$ 6.49	0.90	0.60
LDL colesterolo (mg/dl)	93.84 $\pm$ 25.45	88.5 $\pm$ 23.61	99.34 $\pm$ 26.27	87.46 $\pm$ 28.23	83.54 $\pm$ 25.32	91.66 $\pm$ 30.71	-6.34 $\pm$ 20.7	<b>0.0011</b>	-5.18 $\pm$ 19.0	<b>0.0357</b>	-7.58 $\pm$ 22.46	<b>0.0128</b>	0.90
Trigliceridemia (mg/dl)	114.44 $\pm$ 57.66	111.08 $\pm$ 51.99	117.91 $\pm$ 63.21	99.66 $\pm$ 46.65	99.9 $\pm$ 45.4	99.4 $\pm$ 48.34	-11.3 $\pm$ 39.4	<b>0.0021</b>	-9.48 $\pm$ 39.3	0.06	-13.31 $\pm$ 39.7	<b>0.0134</b>	0.69
Glicemia Basale (mg/dl)	101.91 $\pm$ 10.35	103.68 $\pm$ 11.25	100.08 $\pm$ 9.07	102.08 $\pm$ 10.54	103.77 $\pm$ 12.04	100.23 $\pm$ 8.34	-0.22 $\pm$ 8.18	0.77	-0.19 $\pm$ 7.58	0.84	-0.25 $\pm$ 8.86	0.83	0.60
PAS (mmHg)	132.35 $\pm$ 18.04	131.88 $\pm$ 19.28	132.83 $\pm$ 16.8	125.78 $\pm$ 16.38	126.63 $\pm$ 15.33	124.86 $\pm$ 17.53	-6.93 $\pm$ 16.13	<b>&lt;.0001</b>	-5.61 $\pm$ 16.11	<b>0.008</b>	-8.33 $\pm$ 16.18	<b>0.0002</b>	0.34
PAD (mmHg)	79.42 $\pm$ 10.16	79.86 $\pm$ 9.46	78.97 $\pm$ 10.9	75.71 $\pm$ 10.13	76.6 $\pm$ 9.02	74.76 $\pm$ 11.2	-3.73 $\pm$ 7.79	<b>&lt;.0001</b>	-3.42 $\pm$ 7.71	<b>0.0009</b>	-4.05 $\pm$ 7.93	<b>0.0003</b>	0.67
hs-PCR (mg/dl)	1.59 $\pm$ 2.09	1.63 $\pm$ 2.45	1.55 $\pm$ 1.66	2.11 $\pm$ 4.97	2.72 $\pm$ 6.43	1.47 $\pm$ 2.53	0.54 $\pm$ 4.71	0.20	1.01 $\pm$ 5.98	0.18	0.05 $\pm$ 2.76	0.89	0.33
Score MeDAS	7.25 $\pm$ 1.6	7.14 $\pm$ 1.75	7.36 $\pm$ 1.43	9 $\pm$ 1.93	8.16 $\pm$ 1.71	9.91 $\pm$ 1.75	1.78 $\pm$ 2.12	<b>&lt;.0001</b>	1.03 $\pm$ 1.78	<b>&lt;.0001</b>	2.6 $\pm$ 2.18	<b>&lt;.0001</b>	<b>0.0001</b>

HDL: lipoproteine ad alta densità; LDL: lipoproteine a bassa densità; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; hs-PCR: Proteina C-reattiva ad alta sensibilità; MeDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener by Martinez-Gonzalez et al. [207]

**TABELLA 7:** Coefficienti di correlazione tra le variazioni dei parametri antropometrici e biochimici (T3-T0) e la variazione dello score MeDAS (T3-T0), in tutto il campione

	<b>Score MeDAS delta T3-T0</b>	<b>p-value</b>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0.34	<b>0.0001</b>
Circonferenza periombelicale (cm)	-0.25	<b>0.005</b>
Colesterolo totale (mg/dl)	-0.40	<b>&lt;.0001</b>
HDL colesterolo (mg/dl)	0.02	0.83
LDL colesterolo (mg/dl)	-0.37	<b>&lt;.0001</b>
Trigliceridemia (mg/dl)	-0.26	<b>0.005</b>
Glicemia basale (mg/dl)	-0.15	0.09
PAS (mmHg)	-0.09	0.30
PAD (mmHg)	-0.08	0.34
hs-PCR (mg/dl)	-0.22	<b>0.01</b>

MeDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener by Martinez-Gonzalez et al. [207]; IMC: Indice di massa corporea; HDL: lipoproteine ad alta densità; LDL: lipoproteine a bassa densità; PAS: pressione arteriosa sistolica; PAD: pressione arteriosa diastolica; hs-PCR: Proteina C-reattiva ad alta sensibilità

**TABELLA 8:** Livelli acidi grassi ematici (%) nell'intero campione e stratificati per braccio di trattamento, misurati al tempo T0, al tempo T3, e variazione T3-T0 (media  $\pm$  deviazione standard)

	T0				T3				Differenza T3-T0						
	Tutti	DC	DM	p-value tra gruppi	Tutti	DC	DM	p-value tra gruppi	Tutti	p-value	DC	p-value	DM	p-value	p-value tra gruppi
16:0 (acido palmitico)	24.25±3.07	24.35±2.96	24.15±3.21	0.54	23.37±2.36	23.71±2.23	23±2.45	0.048	-0.77±2.86	0.004	-0.65±2.81	0.07	-0.89±2.94	0.025	0.42
18:0 (acido stearico)	10.79±1.53	10.77±1.43	10.81±1.64	0.78	10.23±0.97	10.32±0.98	10.13±0.96	0.33	-0.58±1.29	<.0001	-0.45±1.07	0.002	-0.71±1.49	0.001	0.33
20:0	0.43±0.25	0.43±0.24	0.43±0.27	0.94	0.34±0.1	0.33±0.1	0.34±0.09	0.59	-0.09±0.22	<.0001	-0.1±0.21	0.000	-0.08±0.23	0.012	0.26
22:0	1.05±0.27	1.03±0.25	1.07±0.29	0.41	0.99±0.21	0.99±0.2	1±0.22	0.92	-0.05±0.31	0.06	-0.04±0.27	0.27	-0.07±0.35	0.13	0.49
24:0	1.99±0.71	1.95±0.52	2.03±0.87	0.67	1.94±0.61	1.94±0.52	1.93±0.7	0.29	-0.07±0.83	0.38	-0.01±0.67	0.91	-0.13±0.98	0.32	0.57
16:1 (acido palmitoleico)	1.87±0.74	1.99±0.81	1.76±0.64	0.09	1.7±0.62	1.8±0.68	1.59±0.53	0.08	-0.15±0.53	0.005	-0.19±0.58	0.012	-0.1±0.48	0.10	0.90
18:1 (acido oleico)	18.86±3.45	18.43±3.24	19.3±3.64	0.12	19.86±2.54	19.61±2.31	20.13±2.75	0.51	0.93±3.33	0.003	1.14±3.31	0.009	0.7±3.36	0.12	0.34
18:1 n-7	1.58±0.23	1.58±0.22	1.58±0.24	0.88	1.63±0.2	1.65±0.18	1.62±0.23	0.29	0.06±0.2	0.001	0.07±0.21	0.013	0.06±0.19	0.020	0.74
20:1	0.21±0.16	0.22±0.19	0.2±0.12	0.85	0.18±0.04	0.18±0.03	0.19±0.05	0.66	-0.02±0.16	0.48	-0.04±0.19	0.08	0±0.1	0.77	0.49
22:1	0.09±0.02	0.12±0.27	0.06±0.1	0.34	0.04±0.04	0.04±0.04	0.03±0.03	0.57	-0.05±0.2	<.0001	-0.07±0.26	0.029	-0.02±0.1	0.09	0.90
24:1	2.48±0.51	2.46±0.46	2.5±0.56	0.97	2.64±0.45	2.62±0.44	2.66±0.47	0.59	0.14±0.52	0.004	0.17±0.45	0.004	0.11±0.58	0.17	0.70
20:3 n-9	0.19±0.14	0.21±0.16	0.16±0.11	0.03	0.14±0.05	0.14±0.06	0.14±0.04	0.82	-0.05±0.13	<.0001	-0.07±0.14	0.001	-0.03±0.11	0.05	0.12
18:2 n-6 (acido linoleico LA)	17.3±3.28	17.1±3.56	17.52±2.99	0.45	18.16±2.51	18.09±2.83	18.23±2.15	0.76	0.75±2.76	0.004	0.91±2.74	0.011	0.58±2.8	0.12	0.53
18:3 n-6 (acido γ-linolenico GLA)	0.52±0.27	0.54±0.25	0.51±0.29	0.15	0.42±0.14	0.42±0.13	0.42±0.15	0.42	-0.09±0.28	0.0002	-0.12±0.27	0.002	-0.07±0.29	0.08	0.14
20:3 n-6 (acido diomo-γ-linolenico DHGLA)	1.58±0.33	1.54±0.3	1.62±0.35	0.13	1.48±0.3	1.43±0.29	1.53±0.3	0.01	-0.11±0.25	<.0001	-0.11±0.24	0.001	-0.11±0.27	0.004	0.86
20:4 n-6 (acido arachidonico AA)	10.44±2.41	10.75±2.44	10.13±2.37	0.14	10.7±2.09	10.68±1.99	10.73±2.21	0.69	0.28±1.93	0.11	-0.01±1.96	0.95	0.6±1.86	0.017	0.049
22:4n-6	1.05±0.41	1.08±0.4	1.01±0.42	0.25	0.99±0.35	1±0.35	0.97±0.35	0.78	-0.07±0.36	0.048	-0.07±0.34	0.09	-0.06±0.38	0.27	0.85
22:5 n-6	0.29±0.16	0.3±0.16	0.27±0.15	0.25	0.27±0.15	0.26±0.12	0.27±0.17	0.54	-0.02±0.2	0.32	-0.04±0.19	0.14	0±0.22	0.99	0.42
18:3 n-3 (acido alfa-linolenico ALA)	0.39±0.26	0.39±0.28	0.39±0.24	0.66	0.33±0.14	0.34±0.16	0.32±0.11	0.99	-0.04±0.27	0.38	-0.05±0.3	0.19	-0.03±0.23	0.27	0.90



	T0				T3				Differenza T3-T0						
	Tutti	DC	DM	p-value tra gruppi	Tutti	DC	DM	p-value tra gruppi	Tutti	p-value	DC	p-value	DM	p-value	p-value tra gruppi
20:5 n-3 (acidosapentaenoico EPA)	0.84±0.48	0.88±0.48	0.8±0.47	0.27	0.87±0.47	0.83±0.44	0.91±0.5	0.27	0.02±0.49	0.32	-0.04±0.41	0.417	0.09±0.56	0.22	0.07
22:5 n-3 (acido docosapentaenoico DPA n-3)	0.99±0.53	1.02±0.53	0.95±0.53	0.28	0.82±0.24	0.81±0.25	0.84±0.24	0.41	-0.15±0.48	<b>0.045</b>	-0.2±0.46	<b>0.001</b>	-0.11±0.51	0.11	0.11
22:6 n-3 (acido docosaesenoico DHA)	2.81±1.04	2.88±1.03	2.74±1.06	0.43	2.92±0.92	2.82±0.95	3.04±0.87	0.14	0.11±0.91	0.17	-0.03±0.92	0.77	0.27±0.89	<b>0.023</b>	0.12
Saturi totali	38.51±4.18	38.52±4.07	38.5±4.33	0.77	36.86±2.73	37.29±2.72	36.39±2.7	<b>0.04</b>	-1.55±3.81	<b>&lt;.0001</b>	-1.25±3.66	<b>0.009</b>	-1.88±3.98	<b>0.001</b>	0.40
Monoinsaturi totali	25.09±3.46	24.81±3.27	25.39±3.65	0.28	26.05±2.82	25.89±2.65	26.22±3	0.82	0.91±3.28	<b>0.003</b>	1.08±3.18	<b>0.010</b>	0.74±3.4	0.10	0.42
Polinsaturi totali	36.4±4.42	36.67±4.78	36.11±4.04	0.38	37.09±4.11	36.81±4.11	37.39±4.13	0.32	0.64±3.96	0.08	0.17±4.14	0.75	1.14±3.73	<b>0.023</b>	0.10
Indice di Insaturazione	141.1±16.4	142.6±16.4	139.6±16.3	0.26	143.5±13.9	142.2±13.4	145.0±14.5	0.13	2.35±14.38	0.08	-0.06±14.46	0.98	4.92±13.97	<b>0.010</b>	<b>0.032</b>
n-6	31.18±3.81	31.3±4.23	31.06±3.36	0.57	32.01±3.39	31.88±3.51	32.15±3.29	0.58	0.75±3.39	<b>0.017</b>	0.56±3.56	0.22	0.95±3.21	<b>0.028</b>	0.40
n-3	5.03±1.84	5.17±1.83	4.88±1.85	0.24	4.94±1.5	4.79±1.54	5.11±1.46	0.20	-0.06±1.6	0.68	-0.32±1.48	0.09	0.22±1.67	0.32	<b>0.026</b>
n-6/n-3	7.19±30	7.01±3	7.38±3.01	0.24	7.1±2.28	7.35±2.37	6.84±2.16	0.18	-0.17±2.59	0.47	0.24±2.36	0.42	-0.62±2.76	0.10	0.04
DHA/AA	0.27±0.1	0.27±0.1	0.27±0.09	0.97	0.28±0.09	0.27±0.09	0.29±0.08	0.09	0±0.07	0.48	0±0.08	0.69	0.01±0.07	0.13	0.18
EPA/AA	0.08±0.05	0.09±0.06	0.08±0.05	0.73	0.08±0.05	0.08±0.05	0.09±0.05	0.32	0±0.05	0.92	0±0.04	0.44	0.01±0.06	0.48	0.26
n-3 HUFA	4.64±1.73	4.78±1.71	4.5±1.75	0.22	4.61±1.46	4.45±1.49	4.79±1.42	0.19	-0.02±1.49	0.90	-0.27±1.39	0.13	0.26±1.55	0.21	<b>0.039</b>
n-6 HUFA	13.35±2.97	13.66±2.94	13.03±2.99	0.20	13.43±2.46	13.37±2.3	13.5±2.64	0.57	0.09±2.43	0.68	-0.23±2.45	0.46	0.44±2.37	0.16	0.10
AA/DHGLA	6.77±1.71	7.16±1.84	6.37±1.47	<b>0.01</b>	7.48±2.03	7.77±2.15	7.17±1.86	0.12	0.77±1.45	<b>&lt;.0001</b>	0.64±1.58	<b>0.002</b>	0.9±1.29	<b>&lt;.0001</b>	0.32
DHA/ALA	9.13±4.42	9.71±4.96	8.53±3.72	0.22	9.95±4.17	9.67±4.27	10.24±4.08	0.43	0.62±5.54	0.22	-0.08±5.87	0.92	1.37±5.11	<b>0.046</b>	0.12
ALA/LA	0.02±0.02	0.03±0.03	0.02±0.02	0.83	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.69	-0.01±0.02	<b>0.013</b>	-0.01±0.03	0.05	0±0.02	0.12	0.77

DC: dieta convenzionale per il controllo del rischio cardiovascolare; DM: dieta mediterranea

**TABELLA 9:** Coefficienti di correlazione tra score e item MeDAS e AG ematici (%) al tempo T3. In diversi toni di rosso: correlazioni positive; in diversi toni di blu: correlazioni negative; i coefficienti di correlazione non significativi sono stati omessi

	Olio oliva	Verdura	Frutta	Carni rosse	Burro	Bibite dolci	Vino	Dolci	Legumi	Pesce	Frutta secca	Carne bianca vs. rossa	Soffritto	Score MeDAS
16:0 (acido palmitico)							0.33				-0.34			-0.21
18:0 (acido stearico)													0.23	
20:0												0.28		0.22
22:0													0.21	
24:0														
16:1 (acido palmitoleico)	-0.28					0.23					-0.26	-0.20		-0.32
18:1 (acido oleico)											-0.27			
18:1 n-7								-0.26			-0.34			
20:1						-0.19						0.21		0.27
22:1													0.20	
24:1	0.26	0.25										0.19	0.18	0.33
20:3 n-9			-0.23				-0.19		-0.18	-0.27				-0.21
18:2 n-6 (acido linoleico LA)				-0.27							0.40		-0.18	
18:3 n-6 (acido γ-linolenico GLA)						0.30								
20:3 n-6 (acido diomo-γ-linolenico DHGLA)														
20:4 n-6 (acido arachidonico AA)							-0.19			-0.27				
22:4 n-6		-0.27	-0.29				-0.18			-0.42				-0.28
22:5 n-6		-0.18					-0.18		-0.29	-0.32				-0.25
18:3 n-3 (acido alfa-linolenico ALA)											0.32			
20:5 n-3 (acido eicosapentaenoico EPA)		0.22	-0.22			-0.26	0.22			0.38	0.32			0.28
22:5 n-3 (acido docosapentaenoico DPA n-3)			-0.18								0.21			
22:6 n-3 (acido docosaesaenoico DHA)										0.25				
Saturi totali							0.23				-0.23			
Monounsaturi totali											-0.29			
Polinsaturi totali				-0.25			-0.19				0.37			
Indice di Insaturazione											0.27			
n-6				-0.18			-0.25				0.33			
n-3						-0.21				0.27	0.24			0.19
n-6/n-3						0.21				-0.33	-0.19			-0.19
n-3 HUFA						-0.25				0.26	0.23			0.20
n-6 HUFA							-0.24			-0.26				
Indice n-3 HUFA %						-0.28				0.44	0.21			0.25

MeDAS: Mediterranean Diet Adherence Screener by Martinez-Gonzalez et al. [207]

## BIBLIOGRAFIA

1. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-171.
2. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. Eur Heart J, 2016. **37**(42): p. 3232-3245.
3. Barquera, S., et al., *Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 328-38.
4. Piepoli, M.F., et al., *2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)*. Eur Heart J, 2016. **37**(29): p. 2315-2381.
5. Badimon, L., G. Vilahur, and T. Padro, *Lipoproteins, platelets and atherothrombosis*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(10): p. 1161-78.
6. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
7. Ross, R. and J.A. Glomset, *The Pathogenesis of Atherosclerosis*. New England Journal of Medicine, 1976. **295**(7): p. 369-377.
8. Stoll, G. and M. Bendszus, *Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization*. Stroke, 2006. **37**(7): p. 1923-32.
9. Eren, E., N. Yilmaz, and O. Aydin, *Functionally defective high-density lipoprotein and paraoxonase: a couple for endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Cholesterol, 2013. **2013**: p. 792090.
10. Nakajima, K., T. Nakano, and A. Tanaka, *The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma*. Clin Chim Acta, 2006. **367**(1-2): p. 36-47.
11. Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 279-367.
12. Ghosh, S., et al., *Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis*. Vascul Pharmacol, 2010. **52**(1-2): p. 1-10.
13. Sary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
14. Tse, K., et al., *T cells in atherosclerosis*. Int Immunol, 2013. **25**(11): p. 615-22.
15. Smeets, E., S. Meiler, and E. Lutgens, *Lymphocytic tumor necrosis factor receptor superfamily co-stimulatory molecules in the pathogenesis of atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(6): p. 518-24.
16. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
17. Hutter, R., et al., *Macrophages transmit potent proangiogenic effects of oxLDL in vitro and in vivo involving HIF-1alpha activation: a novel aspect of angiogenesis in atherosclerosis*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(4): p. 558-69.

18. Shah, P.K., *Mechanisms of plaque vulnerability and rupture*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(4 Suppl S): p. 15S-22S.
19. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. Circulation, 2001. **104**(3): p. 365-72.
20. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999-1008.
21. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. The Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-952.
22. Timmis, A., et al., *European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017*. Eur Heart J, 2018. **39**(7): p. 508-579.
23. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
24. Sniderman, A.D. and C.D. Furberg, *Age as a modifiable risk factor for cardiovascular disease*. Lancet, 2008. **371**(9623): p. 1547-9.
25. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 791-8.
26. Dhingra, R. and R.S. Vasan, *Age as a risk factor*. Med Clin North Am, 2012. **96**(1): p. 87-91.
27. Maas, A.H. and Y.E. Appelman, *Gender differences in coronary heart disease*. Neth Heart J, 2010. **18**(12): p. 598-602.
28. Intapad, S., et al., *Sex differences in the developmental origins of cardiovascular disease*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(2): p. 122-32.
29. Appelman, Y., et al., *Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention*. Atherosclerosis, 2015. **241**(1): p. 211-8.
30. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring*. JAMA, 2004. **291**(18): p. 2204-11.
31. Sesso, H.D., et al., *Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women*. Circulation, 2001. **104**(4): p. 393-8.
32. Chow, C.K., et al., *Parental history and myocardial infarction risk across the world: the INTERHEART Study*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(5): p. 619-27.
33. Murabito, J.M., et al., *Sibling cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults*. JAMA, 2005. **294**(24): p. 3117-23.
34. Grundy, S.M., *Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 1998. **81**(4A): p. 18B-25B.
35. Stamler, J., D. Wentworth, and J.D. Neaton, *Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*. JAMA, 1986. **256**(20): p. 2823-8.
36. Pekkanen, J., et al., *Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease*. N Engl J Med, 1990. **322**(24): p. 1700-7.
37. Pereira, T., *Dyslipidemia and Cardiovascular Risk: Lipid Ratios as Risk Factors for Cardiovascular Disease* 2012.
38. Gordon, D.J., et al., *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies*. Circulation, 1989. **79**(1): p. 8-15.

39. McBride, P., *Triglycerides and risk for coronary artery disease*. Curr Atheroscler Rep, 2008. **10**(5): p. 386-90.
40. *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks* 2009, Geneva: World Health Organization. 62 pp.
41. *Global status report on noncommunicable diseases* 2010, Geneva: World Health Organization.
42. *Prevention of cardiovascular disease : guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk* 2007, Geneva: World Health Organization. 86 pp.
43. Danaei, G., et al., *National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants*. Lancet, 2011. **377**(9765): p. 568-77.
44. Boden-Albala, B., et al., *Diabetes, fasting glucose levels, and risk of ischemic stroke and vascular events: findings from the Northern Manhattan Study (NOMAS)*. Diabetes Care, 2008. **31**(6): p. 1132-7.
45. Leon, B.M. and T.M. Maddox, *Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research*. World J Diabetes, 2015. **6**(13): p. 1246-58.
46. Matheus, A.S., et al., *Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update*. Int J Hypertens, 2013. **2013**: p. 653789.
47. Frostegard, J., *Immune mechanisms in atherosclerosis, especially in diabetes type 2*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 162.
48. Patil, V.C., et al., *Diastolic dysfunction in asymptomatic type 2 diabetes mellitus with normal systolic function*. J Cardiovasc Dis Res, 2011. **2**(4): p. 213-22.
49. Brooks, B.A., et al., *Diastolic dysfunction and abnormalities of the microcirculation in type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(9): p. 739-46.
50. Shivalkar, B., et al., *Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus*. Am J Cardiol, 2006. **97**(1): p. 77-82.
51. Sharma, S., et al., *Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1692-700.
52. McGavock, J.M., et al., *Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study*. Circulation, 2007. **116**(10): p. 1170-5.
53. Rijzewijk, L.J., et al., *Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1793-9.
54. Aasum, E., et al., *Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 434-41.
55. From, A.M., et al., *Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population*. Am J Med, 2006. **119**(7): p. 591-9.
56. Williams, I.L., B. Noronha, and A.G. Zaman, *Review: The management of acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus*. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease, 2003. **3**(5): p. 319-324.
57. Ceriello, A., et al., *Evidence for a hyperglycaemia-dependent decrease of antithrombin III-thrombin complex formation in humans*. Diabetologia, 1990. **33**(3): p. 163-7.
58. Li, Y. and W. Aronow, *Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease*. J Clinic Experiment Cardiol, 2011. **2**(114).
59. Doll, R., et al., *Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors*. BMJ, 2004. **328**(7455): p. 1519.
60. Wendel-Vos, G.C., et al., *Physical activity and stroke. A meta-analysis of observational data*. Int J Epidemiol, 2004. **33**(4): p. 787-98.

61. Berlin, J.A. and G.A. Colditz, *A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease*. Am J Epidemiol, 1990. **132**(4): p. 612-28.
62. Oguma, Y. and T. Shinoda-Tagawa, *Physical activity decreases cardiovascular disease risk in women: review and meta-analysis*. Am J Prev Med, 2004. **26**(5): p. 407-18.
63. Lee, C.D., A.R. Folsom, and S.N. Blair, *Physical activity and stroke risk: a meta-analysis*. Stroke, 2003. **34**(10): p. 2475-81.
64. Rogers, M.A., *Acute effects of exercise on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetes*. Med Sci Sports Exerc, 1989. **21**(4): p. 362-8.
65. Whelton, S.P., et al., *Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials*. Ann Intern Med, 2002. **136**(7): p. 493-503.
66. Kelley, G.A., K.S. Kelley, and Z. Vu Tran, *Aerobic exercise, lipids and lipoproteins in overweight and obese adults: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Int J Obes (Lond), 2005. **29**(8): p. 881-93.
67. Wei, M., et al., *Changes in lipids associated with change in regular exercise in free-living men*. J Clin Epidemiol, 1997. **50**(10): p. 1137-42.
68. Gautier, J.F., *[Physical activity and type 2 diabetes]*. Rev Med Liege, 2005. **60**(5-6): p. 395-401.
69. Wei, M., et al., *Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes*. Ann Intern Med, 2000. **132**(8): p. 605-11.
70. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014. **384**(9945): p. 766-81.
71. *Obesity: Third report of Session 2003-04*. Vol. I: Report, together with formal minutes. Document HC 23-1. 2004, London: Government of Great Britain, House of Commons. 148 pp.
72. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
73. Eckel, R.H., et al., *2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2014. **129**(25 Suppl 2): p. S76-99.
74. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. **368**(14): p. 1279-90.
75. Keys, A., *Coronary heart disease in seven countries*. 1970. Nutrition, 1997. **13**(3): p. 250-2; discussion 249, 253.
76. Sofi, F., et al., *Attuali conoscenze sui rapporti tra dieta mediterranea e stato di salute* 2009. 127-131.
77. Serra-Majem, L. and F.X. Medina, *Chapter 4 - The Mediterranean Diet as an Intangible and Sustainable Food Culture*, in *The Mediterranean Diet*, V.R. Preedy and R.R. Watson, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 37-46.
78. Hooper, L., et al., *Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(6): p. CD011737.
79. Bach-Faig, A., et al., *Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates*. Public Health Nutr, 2011. **14**(12A): p. 2274-84.
80. Mila-Villarreal, R., et al., *Comparison and evaluation of the reliability of indexes of adherence to the Mediterranean diet*. Public Health Nutr, 2011. **14**(12A): p. 2338-45.
81. Trichopoulou, A., et al., *Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study*. BMJ, 2005. **330**(7498): p. 991.

82. Guallar-Castillon, P., et al., *Major dietary patterns and risk of coronary heart disease in middle-aged persons from a Mediterranean country: the EPIC-Spain cohort study*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(3): p. 192-9.
83. Estruch, R., et al., *Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts*. N Engl J Med, 2018. **378**(25): p. e34.
84. Panagiotakos, D.B., C. Pitsavos, and C. Stefanadis, *Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(8): p. 559-68.
85. Goulet, J., et al., *Effect of a nutritional intervention promoting the Mediterranean food pattern on plasma lipids, lipoproteins and body weight in healthy French-Canadian women*. Atherosclerosis, 2003. **170**(1): p. 115-24.
86. Gerber, M., *Qualitative methods to evaluate Mediterranean diet in adults*. Public Health Nutr, 2006. **9**(1A): p. 147-51.
87. Trichopoulou, A., et al., *Diet and overall survival in elderly people*. BMJ, 1995. **311**(7018): p. 1457-60.
88. Trichopoulou, A., et al., *Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2599-608.
89. Agnoli, C., et al., *A priori-defined dietary patterns are associated with reduced risk of stroke in a large Italian cohort*. J Nutr, 2011. **141**(8): p. 1552-8.
90. Martinez-Gonzalez, M.A., et al., *Mediterranean diet and the incidence of cardiovascular disease: a Spanish cohort*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2011. **21**(4): p. 237-44.
91. Willett, W.C., et al., *Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating*. Am J Clin Nutr, 1995. **61**(6 Suppl): p. 1402S-1406S.
92. Das, U.N., *Chapter 21 - Mediterranean Diet Is Beneficial: But, How, and Why?*, in *Role of the Mediterranean Diet in the Brain and Neurodegenerative Diseases*, T. Farooqui and A.A. Farooqui, Editors. 2018, Academic Press. p. 333-340.
93. Sofi, F., et al., *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis*. BMJ, 2008. **337**: p. a1344.
94. Sofi, F., et al., *Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(5): p. 1189-96.
95. Sofi, F., et al., *Mediterranean diet and health*. Biofactors, 2013. **39**(4): p. 335-42.
96. Micha, R., S.K. Wallace, and D. Mozaffarian, *Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2010. **121**(21): p. 2271-83.
97. Hoevenaar-Blom, M.P., et al., *Mediterranean Style Diet and 12-Year Incidence of Cardiovascular Diseases: The EPIC-NL Cohort Study*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45458.
98. de Lorgeril, M., et al., *Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study*. Circulation, 1999. **99**(6): p. 779-85.
99. Karageorgou, D., R. Micha, and A. Zampelas, *Chapter 9 - Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease: An Overview of Recent Evidence*, in *The Mediterranean Diet*, V.R. Preedy and R.R. Watson, Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 91-104.
100. Pitsavos, C., et al., *Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study*. Am J Clin Nutr, 2005. **82**(3): p. 694-9.

101. Kastorini, C.M., et al., *The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(11): p. 1299-313.
102. Nordmann, A.J., et al., *Meta-analysis comparing Mediterranean to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factors*. Am J Med, 2011. **124**(9): p. 841-51 e2.
103. Sola, R., et al., *Effect of a traditional Mediterranean diet on apolipoproteins B, A-I, and their ratio: a randomized, controlled trial*. Atherosclerosis, 2011. **218**(1): p. 174-80.
104. Carey, M.C., D.M. Small, and C.M. Bliss, *Lipid digestion and absorption*. Annu Rev Physiol, 1983. **45**: p. 651-77.
105. Sampath, H. and J.M. Ntambi, *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression*. Nutr Rev, 2004. **62**(9): p. 333-9.
106. Bezard, J., et al., *The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues*. Reprod Nutr Dev, 1994. **34**(6): p. 539-68.
107. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. **1**(4): p. 420-39.
108. Crawford, M.A. and P. Stevens, *A study on essential fatty acids and multiple sclerosis*. Prog Lipid Res, 1981. **20**: p. 255-8.
109. Sprecher, H. and S.K. Sankarap, *The organic synthesis of unsaturated fatty acids*. Prog Lipid Res, 1981. **20**: p. 769-71.
110. Visioli, F., et al., *Lipid transport, dietary fats, and endogenous lipid synthesis: hypotheses on saturation and competition processes*. Nutr Health, 2006. **18**(2): p. 127-32.
111. Luthria, D.L., B.S. Mohammed, and H. Sprecher, *Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(27): p. 16020-5.
112. Galli, C. and F. Marangoni, *Recent advances in the biology of n-6 fatty acids*. Nutrition, 1997. **13**(11-12): p. 978-85.
113. Rise, P., et al., *Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids is inhibited in vivo in hypercholesterolemic rabbits and in vitro by oxysterols*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. **71**(2): p. 79-86.
114. German, J.B., B. Lokesh, and J.E. Kinsella, *The effect of dietary fish oils on eicosanoid biosynthesis in peritoneal macrophages is influenced by both dietary N-6 polyunsaturated fats and total dietary fat*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1988. **34**(1): p. 37-45.
115. Wada, M., et al., *Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22254-66.
116. Mensink, R.P., et al., *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(5): p. 1146-55.
117. Hu, F.B., et al., *Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women*. N Engl J Med, 1997. **337**(21): p. 1491-9.
118. Jakobsen, M.U., et al., *Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(5): p. 1425-32.
119. Li, Y., et al., *Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease: A Prospective Cohort Study*. J Am Coll Cardiol, 2015. **66**(14): p. 1538-1548.
120. Howard, B.V., et al., *Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial*. JAMA, 2006. **295**(6): p. 655-66.



121. de Oliveira Otto, M.C., et al., *Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(2): p. 397-404.
122. Praagman, J., et al., *The association between dietary saturated fatty acids and ischemic heart disease depends on the type and source of fatty acid in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Netherlands cohort*. Am J Clin Nutr, 2016. **103**(2): p. 356-65.
123. Chen, M., et al., *Dairy fat and risk of cardiovascular disease in 3 cohorts of US adults*. Am J Clin Nutr, 2016. **104**(5): p. 1209-1217.
124. Hu, F.B., et al., *Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(6): p. 1001-8.
125. Zong, G., et al., *Intake of individual saturated fatty acids and risk of coronary heart disease in US men and women: two prospective longitudinal cohort studies*. BMJ, 2016. **355**: p. i5796.
126. A., K., *Coronary heart disease in seven countries. Summary*. Circulation, 1970. **41**(4 Suppl): p. I186-95.
127. Kris-Etherton, P.M., AHA Science Advisory. *Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease*. American Heart Association. Nutrition Committee. Circulation, 1999. **100**(11): p. 1253-8.
128. McMurray, H.F., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 1004-8.
129. Pacheco, Y.M., et al., *A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects*. J Nutr Biochem, 2008. **19**(3): p. 200-5.
130. Wu, J.H., et al., *Association of plasma phospholipid long-chain omega-3 fatty acids with incident atrial fibrillation in older adults: the cardiovascular health study*. Circulation, 2012. **125**(9): p. 1084-93.
131. Chowdhury, R., et al., *Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis*. Ann Intern Med, 2014. **160**(6): p. 398-406.
132. Schwingshackl, L. and G. Hoffmann, *Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Lipids Health Dis, 2014. **13**: p. 154.
133. Wang, D.D., et al., *Association of Specific Dietary Fats With Total and Cause-Specific Mortality*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(8): p. 1134-45.
134. Guasch-Ferre, M., et al., *Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2015. **102**(6): p. 1563-73.
135. Martinez-Gonzalez, M.A., L.J. Dominguez, and M. Delgado-Rodriguez, *Olive oil consumption and risk of CHD and/or stroke: a meta-analysis of case-control, cohort and intervention studies*. Br J Nutr, 2014. **112**(2): p. 248-59.
136. Ollis, T.E., B.J. Meyer, and P.R. Howe, *Australian food sources and intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids*. Ann Nutr Metab, 1999. **43**(6): p. 346-55.
137. Crawford, M.A., et al., *Docosahexaenoic acid and cerebral evolution*. World Rev Nutr Diet, 2001. **88**: p. 6-17.
138. Mori, T.A. and L.J. Beilin, *Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(1): p. 11-7.

139. Bemrah, N., et al., *Fish and seafood consumption and omega 3 intake in French coastal populations: CALIPSO survey*. Public Health Nutr, 2008: p. 1-10.
140. Aidos, I., et al., *Chemical and sensory evaluation of crude oil extracted from herring byproducts from different processing operations*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(7): p. 1897-903.
141. Abdelhamid, A.S., et al., *Polyunsaturated fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **7**: p. CD012345.
142. Kris-Etherton, P.M. and S. Yu, *Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(5 Suppl): p. 1628S-1644S.
143. Blasbalg, T.L., et al., *Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(5): p. 950-62.
144. Ramsden, C.E., et al., *n-6 fatty acid-specific and mixed polyunsaturate dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomised controlled trials*. Br J Nutr, 2010. **104**(11): p. 1586-600.
145. Ramsden, C.E., et al., *Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis*. BMJ, 2013. **346**: p. e8707.
146. Coles, B., et al., *Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 375-81.
147. Harris, W.S., et al., *Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2009. **119**(6): p. 902-7.
148. Harris, W.S. and G.C. Shearer, *Omega-6 fatty acids and cardiovascular disease: friend, not foe?* Circulation, 2014. **130**(18): p. 1562-4.
149. Pischon, T., et al., *Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women*. Circulation, 2003. **108**(2): p. 155-60.
150. Ferrucci, L., et al., *Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 439-46.
151. Farvid, M.S., et al., *Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies*. Circulation, 2014. **130**(18): p. 1568-78.
152. Harris, W.S., W.C. Poston, and C.K. Haddock, *Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events*. Atherosclerosis, 2007. **193**(1): p. 1-10.
153. Ramsden, C.E., et al., *Re-evaluation of the traditional diet-heart hypothesis: analysis of recovered data from Minnesota Coronary Experiment (1968-73)*. BMJ, 2016. **353**: p. i1246.
154. Dayton S, P.M., Hashimoto S, Dixon WJ, Tomiyasu U., *A Controlled Clinical Trial of a Diet High in Unsaturated Fat in Preventing Complications of Atherosclerosis*. Circulation, 1969. **40**(II): p. 1-63.
155. Miettinen, M., et al., *Effect of cholesterol-lowering diet on mortality from coronary heart-disease and other causes. A twelve-year clinical trial in men and women*. Lancet, 1972. **2**(7782): p. 835-8.
156. Miettinen, M., et al., *Dietary prevention of coronary heart disease in women: the Finnish mental hospital study*. Int J Epidemiol, 1983. **12**(1): p. 17-25.

157. Turpeinen, O., et al., *Dietary prevention of coronary heart disease: the Finnish Mental Hospital Study*. Int J Epidemiol, 1979. **8**(2): p. 99-118.
158. Leren, P., *The Oslo diet-heart study. Eleven-year report*. Circulation, 1970. **42**(5): p. 935-42.
159. *Controlled trial of soya-bean oil in myocardial infarction*. Lancet, 1968. **2**(7570): p. 693-9.
160. Hooper, L., et al., *Omega-6 fats for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2018. **7**: p. CD011094.
161. Bang, H.O., J. Dyerberg, and A.B. Nielsen, *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos*. Lancet, 1971. **1**(7710): p. 1143-5.
162. De Caterina, R., *n-3 fatty acids in cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2439-50.
163. Harris, W.S., *Are n-3 fatty acids still cardioprotective?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(2): p. 141-9.
164. Harris, W.S., et al., *Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives*. Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 12-24.
165. Mozaffarian, D. and J.H. Wu, *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(20): p. 2047-67.
166. Harris, W.S. and D. Bulchandani, *Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?* Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(4): p. 387-93.
167. Mozaffarian, D., et al., *Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Circulation, 2005. **112**(13): p. 1945-52.
168. Geleijnse, J.M., et al., *Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials*. J Hypertens, 2002. **20**(8): p. 1493-9.
169. Chiuve, S.E., et al., *Dietary fat quality and risk of sudden cardiac death in women*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(3): p. 498-507.
170. Marik, P.E. and J. Varon, *Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review*. Clin Cardiol, 2009. **32**(7): p. 365-72.
171. Mente, A., et al., *A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease*. Arch Intern Med, 2009. **169**(7): p. 659-69.
172. Harris, W.S., et al., *Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids*. J Nutr, 2009. **139**(4): p. 804S-19S.
173. He, K., et al., *Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2705-11.
174. Saravanan, P., et al., *Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids*. Lancet, 2010. **376**(9740): p. 540-50.
175. Galan, P., et al., *Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial*. BMJ, 2010. **341**: p. c6273.
176. Rauch, B., et al., *OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **122**(21): p. 2152-9.
177. Kromhout, D., E.J. Giltay, and J.M. Geleijnse, *n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2010. **363**(21): p. 2015-26.
178. Lichtenstein, A.H., et al., *Effects of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial plasma lipoproteins in humans as part of a National Cholesterol Education Program Step 2 diet*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(10): p. 1533-42.

179. Pan, A., et al., *alpha-Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(6): p. 1262-73.
180. Del Gobbo, L.C., et al., *omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies*. JAMA Intern Med, 2016. **176**(8): p. 1155-66.
181. Mozaffarian, D., et al., *Plasma phospholipid long-chain omega-3 fatty acids and total and cause-specific mortality in older adults: a cohort study*. Ann Intern Med, 2013. **158**(7): p. 515-25.
182. Mozaffarian, D., et al., *Circulating long-chain omega-3 fatty acids and incidence of congestive heart failure in older adults: the cardiovascular health study: a cohort study*. Ann Intern Med, 2011. **155**(3): p. 160-70.
183. Yamagishi, K., J.A. Nettleton, and A.R. Folsom, *Plasma fatty acid composition and incident heart failure in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Am Heart J, 2008. **156**(5): p. 965-74.
184. Skuladottir, G.V., et al., *Plasma n-3 and n-6 fatty acids and the incidence of atrial fibrillation following coronary artery bypass graft surgery*. Eur J Clin Invest, 2011. **41**(9): p. 995-1003.
185. Virtanen, J.K., et al., *Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men*. Circulation, 2009. **120**(23): p. 2315-21.
186. Lemaitre, R.N., et al., *Circulating and dietary alpha-linolenic acid and incidence of congestive heart failure in older adults: the Cardiovascular Health Study*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(2): p. 269-74.
187. Wilk, J.B., et al., *Plasma and dietary omega-3 fatty acids, fish intake, and heart failure risk in the Physicians' Health Study*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(4): p. 882-8.
188. Mozaffarian, D., et al., *Trans fatty acids and cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2006. **354**(15): p. 1601-13.
189. Willett, W.C., et al., *Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women*. Lancet, 1993. **341**(8845): p. 581-5.
190. Ascherio, A., et al., *Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States*. BMJ, 1996. **313**(7049): p. 84-90.
191. Pietinen, P., et al., *Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*. Am J Epidemiol, 1997. **145**(10): p. 876-87.
192. Xu, J., et al., *Dietary fat intake and risk of coronary heart disease: the Strong Heart Study*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(4): p. 894-902.
193. Aro, A., et al., *Adipose tissue isomeric trans fatty acids and risk of myocardial infarction in nine countries: the EURAMIC study*. Lancet, 1995. **345**(8945): p. 273-8.
194. Baylin, A., et al., *High 18:2 trans-fatty acids in adipose tissue are associated with increased risk of nonfatal acute myocardial infarction in costa rican adults*. J Nutr, 2003. **133**(4): p. 1186-91.
195. Clifton, P.M., J.B. Keogh, and M. Noakes, *Trans fatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction*. J Nutr, 2004. **134**(4): p. 874-9.
196. Sun, Q., et al., *A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease*. Circulation, 2007. **115**(14): p. 1858-65.
197. Lemaitre, R.N., et al., *Plasma phospholipid trans fatty acids, fatal ischemic heart disease, and sudden cardiac death in older adults: the cardiovascular health study*. Circulation, 2006. **114**(3): p. 209-15.

198. Wang, Q., et al., *Plasma phospholipid trans-fatty acids levels, cardiovascular diseases, and total mortality: the cardiovascular health study*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(4).
199. Vesper, H.W., et al., *Levels of plasma trans-fatty acids in non-Hispanic white adults in the United States in 2000 and 2009*. JAMA, 2012. **307**(6): p. 562-3.
200. Jakobsen, M.U., et al., *Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease*. Int J Epidemiol, 2008. **37**(1): p. 173-82.
201. Oomen, C.M., et al., *Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study*. Lancet, 2001. **357**(9258): p. 746-51.
202. de Oliveira Otto, M.C., et al., *Biomarkers of dairy fatty acids and risk of cardiovascular disease in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(4): p. e000092.
203. Sun, Q., et al., *Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(4): p. 929-37.
204. Yakoob, M.Y., et al., *Circulating biomarkers of dairy fat and risk of incident stroke in U.S. men and women in 2 large prospective cohorts*. Am J Clin Nutr, 2014. **100**(6): p. 1437-47.
205. Kleber, M.E., et al., *Trans-fatty acids and mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study*. Eur Heart J, 2016. **37**(13): p. 1072-8.
206. Yakoob, M.Y., et al., *Circulating Biomarkers of Dairy Fat and Risk of Incident Diabetes Mellitus Among Men and Women in the United States in Two Large Prospective Cohorts*. Circulation, 2016. **133**(17): p. 1645-54.
207. Martinez-Gonzalez, M.A., et al., *A 14-item Mediterranean diet assessment tool and obesity indexes among high-risk subjects: the PREDIMED trial*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43134.
208. Marangoni, F., C. Colombo, and C. Galli, *A method for the direct evaluation of the fatty acid status in a drop of blood from a fingertip in humans: applicability to nutritional and epidemiological studies*. Anal Biochem, 2004. **326**(2): p. 267-72.
209. Girolì MG, L.F., Amato M, Risé P, Vigo L, et al., *Determinants of the Fatty Acid Profile in Patients with and without Coronary Heart Disease*. JSM Nutritional Disorders, 2017. **1**(1): p. 1005.
210. Barzi, F., et al., *Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial*. Eur J Clin Nutr, 2003. **57**(4): p. 604-11.
211. Itsiopoulos, C., et al., *The AUStralian MEDiterranean Diet Heart Trial (AUSMED Heart Trial): A randomized clinical trial in secondary prevention of coronary heart disease in a multiethnic Australian population: Study protocol*. Am Heart J, 2018. **203**: p. 4-11.
212. Delgado-Lista, J., et al., *CORonary Diet Intervention with Olive oil and cardiovascular PREvention study (the CORDIOPREV study): Rationale, methods, and baseline characteristics: A clinical trial comparing the efficacy of a Mediterranean diet rich in olive oil versus a low-fat diet on cardiovascular disease in coronary patients*. Am Heart J, 2016. **177**: p. 42-50.
213. Treweek, S. and M. Zwarenstein, *Making trials matter: pragmatic and explanatory trials and the problem of applicability*. Trials, 2009. **10**: p. 37.
214. Hebert, J.R., et al., *Perspective: Randomized Controlled Trials Are Not a Panacea for Diet-Related Research*. Adv Nutr, 2016. **7**(3): p. 423-32.
215. Anthonisen, N.R., et al., *The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial*. Ann Intern Med, 2005. **142**(4): p. 233-9.

216. Jha, P. and R. Peto, *Global effects of smoking, of quitting, and of taxing tobacco*. N Engl J Med, 2014. **370**(1): p. 60-8.
217. Pirie, K., et al., *The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK*. Lancet, 2013. **381**(9861): p. 133-41.
218. Psaltopoulou, T., et al., *Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(4): p. 1012-8.
219. Alonso, A. and M.A. Martinez-Gonzalez, *Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study*. Lipids, 2004. **39**(12): p. 1233-8.
220. Williams, C.M. and A. Salter, *Saturated fatty acids and coronary heart disease risk: the debate goes on*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016. **19**(2): p. 97-102.
221. Esposito, K., et al., *Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials*. Metab Syndr Relat Disord, 2011. **9**(1): p. 1-12.
222. Aung, T., et al., *Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals*. JAMA Cardiol, 2018. **3**(3): p. 225-234.
223. Thomazella, M.C., et al., *Effects of high adherence to mediterranean or low-fat diets in medicated secondary prevention patients*. Am J Cardiol, 2011. **108**(11): p. 1523-9.
224. Arnold, L.E., et al., *Omega-3 Fatty Acid Plasma Levels Before and After Supplementation: Correlations with Mood and Clinical Outcomes in the Omega-3 and Therapy Studies*. J Child Adolesc Psychopharmacol, 2017. **27**(3): p. 223-233.
225. Sun, Y., et al., *Plasma alpha-Linolenic and Long-Chain omega-3 Fatty Acids Are Associated with a Lower Risk of Acute Myocardial Infarction in Singapore Chinese Adults*. J Nutr, 2016. **146**(2): p. 275-82.

## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto il Professor Giovanni Di Minno, Coordinatore del Dottorato in Terapie Avanzate Biomediche e Chirurgiche dell'Università Degli studi Federico II di Napoli, per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di studi, e la Professoressa Elena Tremoli, Direttore scientifico del Centro Cardiologico Monzino-IRCCS, per avermi permesso di approfondire molteplici tematiche della prevenzione cardiovascolare e crescere come professionista.

Ringrazio di cuore la Dottoressa Giroli per aver creduto nelle mie potenzialità, per avermi guidata con la sua esperienza e la sua grande disponibilità durante questo progetto di ricerca e questi anni di lavoro insieme.

Un ringraziamento particolare va al Dottor Werba per il prezioso aiuto scientifico e per i suggerimenti ricevuti durante le attività svolte.

Un ringraziamento speciale va ad Alice, la mia compagna di percorso, per aver condiviso con me ogni momento di questa preziosa esperienza.

Infine, desidero ringraziare tutti i miei colleghi per l'incoraggiamento, per avermi sopportato e supportato amichevolmente ed alcuni di loro in particolare, per avermi concesso il loro prezioso tempo ed aver contribuito alla realizzazione del progetto e alla stesura dell'elaborato finale.